

UNIVERSITE DE LYON

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE
DE LYON

Année 1965 - N° 518

LES PORPHYRIES :
Contribution à l'étude qualitative et quantitative
des Isomères I et III de l'Uroporphyrine

THÈSE

pour le DOCTORAT de l'UNIVERSITE DE LYON

SECTION DE PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement

devant LA FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

le 21 Juin 1965

par

M. Michel BOUCHERAT

né le 20 Octobre 1938

à LYON (3e)



F. ANDRE
5 rue Bugeaud
LYON

UNIVERSITE DE LYON

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE
DE LYON

Année 1965 - N° 518

LES PORPHYRIES :

Contribution à l'étude qualitative et quantitative des Isomères I et III de l'Uroporphyrine

THÈSE

pour le DOCTORAT de l'UNIVERSITE DE LYON

SECTION DE PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement

devant LA FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

le 21 Juin 1965

par

M. Michel BOUCHERAT

né le 20 Octobre 1938

à LYON (3e)



F. ANDRE

5 rue Bugeaud

LYON

MM.

GIRARD Paul	Pathologie générale et expérimentale
LATARJET	Anatomie
PEYCELON	Pathologie chirurgicale
GIRARD Marcel	Clinique médicale D
VACHON	Pathologie médicale
GALY	Physio-pathologie des voies respiratoires
PAPILLON	Radiologie
JEUNE	Clinique médicale infantile et Hygiène du premier âge.
GONIN	Thérapeutique
MONNET	Bactériologie
BANSSILLON	Physiologie et pathologie obstétricales
CHATONNET	Physiologie B
GUINET	Clinique endocrinologique
TRILLAT	Clinique de chirurgie orthopédique
FREIDEL	Clinique stomatologique
MARION Joseph	Clinique de chirurgie et d'orthopédie infantiles
DORCHE	Matière médicale et législation pharmaceutique
DUMONT Louis	Histologie et embryologie
PERROT	Chimie
CIER J.F.	Physiologie A
PERRIN J.	Thérapeutique chirurgicale et chirurgie opératoire
MICHAUD Pierre	Clinique de chirurgie cardiaque
SARROUY Charles	Clinique médicale infantile
MATHIEU	Clinique gynécologique
FAUCON	Biologie médicale et pharmacodynamie
X...	Clinique des maladies infectieuses
X...	Hydrologie thérapeutique, climatologie et écologie sociale

MM.

Professeurs à titre personnel

BERGER	Physique nucléaire appliquée à la médecine
BERTOYE	Bactériologie
MANSUY	Neuro-chirurgie
COLLET	Chimie générale et pharmaceutique
LACROIX	Hygiène et climatologie
LIARAS	Clinique chirurgicale propédeutique
LECUIRE	Neuro-chirurgie
REVOL	Médecine générale
GOINARD	Thérapeutique chirurgicale
CIER André	Pharmacie chimique et Pharmacologie
PONT Maurice	Médecine générale
TRAEGER	Médecine générale

MM.

Professeurs sans chaire

ROMAN	Parasitologie
FEROLDI	Anatomie pathologique
MORET	Physique biologique
ODDOUX	Botanique et cryptogamie
de SOLLIERS	Chimie analytique
DESPIERRES	Médecine générale
GARIN	Parasitologie
TOLOT	Médecine du travail

MM.

Maîtres de conférences agrégés titulaires

CREYSSSEL Roger	Chimie biologique
THIVOLET	Hygiène
PINET	Electro-Radiologie
GUYOTAT	Neuro-psychiatrie
DESCOTES	Chirurgie générale
JOUVET	Pathologie expérimentale
PEYRIN	Physique biologique
TOMMASI	Anatomie pathologique
BUFFARD	Electro-radiologie
LEJEUNE	Médecine générale et thérapeutique
de MOURGUES F.	Stomatologie
NAUSSAC	Maladies infectieuses
REBOUILLAT	Chirurgie générale
ROMAGNY	Pédiatrie
DELAHAYE	Médecine générale
DELEUZE	Anesthésiologie
GIRAUD	Electro-radiologie diagnostic et thérapeutique
MICHEL	Anesthésiologie
FRANCOIS	Pédiatrie et puériculture
MICHOULIER	Chirurgie générale
COLOMB	Dermatologie
LAMBERT	Médecine générale
FRIES	Médecine générale
GILLY	Pédiatrie
ROBERT	Médecine générale
BOUCHET	Anatomie
BETHENOD	Pédiatrie
GERMAIN	Immunologie, sérologie, hématologie
KALB	Pneumo-phthisiologie
LARBRE	Pédiatrie
SOUSTELLE	Chirurgie générale
VIALA	Médecine générale
VINCENT	Bactériologie, parasitologie, virologie
COLIN	Médecine légale

MM.

Maîtres de conférences agrégés stagiaires

FAVRE-GILLY	Hématologie
GIROD	Histologie et embryologie
GRAS	Chimie biologique
MALLEIN	Chimie analytique
RIFFAT	Hygiène
FLANDROIS	Physiologie
VIALIER-RAYNARD	Bactériologie
ROLLET	Pharmacie galénique

MM.

Agrégés en exercice

BONAMOUR	Ophtalmologie
de MOURGUES G.	Chirurgie générale
DEVIC	Médecine générale
DUMONT Martial	Obstétrique
DURAND	Urologie
FRANCILLON	Chirurgie générale
SAUBIER	Chirurgie générale
SCHOTT	Neuro-psychiatrie
ALLEGRE	Neuro-chirurgie
CHASSARD	Electro-radiologie
FAYSSE	Orthopédie
GAILLARD	Oto-rhino-laryngologie
GARDE	Médecine générale
HUGONNIER	Ophtalmologie
MARET	Chirurgie générale
MORNEX	Médecine générale
NORMAND	Médecine générale
PERRIN André	Médecine générale
DUMAS	Stomatologie
GARMIER	Obstétrique
NOEL	Médecine générale
SCHNEPP	Orthopédie
MOUNIER-KUHN Alain	Chirurgie générale

Examineurs de la Thèse :

Président : M. le Professeur BADINAND

Assesseurs: M. le Professeur DORCHE
M. le Professeur THIVOLET
M. le Professeur MALLEIN

A MES PARENTS

A MA FAMILLE

A notre Président de Thèse,

Monsieur le Professeur A. BADINAND

Professeur de Chimie Analytique
Biologiste des Hôpitaux de Lyon.

Il nous a fait l'honneur de nous
accueillir dans son laboratoire
de la Faculté et de nous faire
participer aux travaux de sa
Chaire.

C'est grâce à la bienveillance
qu'il nous a toujours témoignée
que ce travail a pu être exécuté
en liaison avec l'Hôpital.

Qu'il nous permette de lui exprimer
nos sentiments de profonde
gratitude et de respectueux dé-
vouement.

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur J. DORCHE

Professeur de Matière Médicale et
de Législation Pharmaceutique
Biologiste des Hôpitaux de Lyon.

Une partie de ce travail a pu être réalisée grâce à l'attention qu'il a bien voulu apporter à certains prélèvements biologiques qui étaient pour nous du plus grand intérêt.

Nous le remercions d'être notre Juge et nous le prions d'accepter l'expression de nos respectueux sentiments.

Monsieur le Professeur J. THIVOLET

Médecin des Hôpitaux de Lyon.

Au cours de trois semestres passés dans son service médical en qualité d'Interne en Pharmacie, nous avons toujours trouvé auprès de lui l'accueil le plus cordial. L'importance qu'il attache à certains problèmes métaboliques fait que nous avons pu effectuer un assez grand nombre de recherches en rapport avec ce travail.

Nous le remercions très vivement de faire partie de ce Jury.

Monsieur le Professeur Agrégé R. MALLEIN

Pharmacien des Hôpitaux de Lyon.

Il nous a inspiré le sujet de ce travail pour lequel il nous a apporté l'aide de ses connaissances et de ses conseils. Depuis longtemps il s'intéresse aux troubles du métabolisme des porphyrines. Nos semestres d'Internat accomplis dans son service hospitalier nous ont permis de participer au développement de leur exploration biochimique.

Nous le remercions sincèrement de toutes ces marques de confiance et de sympathie.

INTRODUCTION

L'analyse des porphyrines dans les milieux biologiques est apparemment simple, la fluorescence pour leur recherche qualitative, la spectrométrie ou la fluorométrie pour leur dosage, devraient théoriquement suffire pour résoudre la plupart des problèmes que posent au biologiste les troubles de leur métabolisme chez l'homme.

Au cours de ces vingt dernières années, les notions essentielles concernant les porphyrines ont été affirmées avec plus de précision ou, parfois, complètement transformées, à la suite des connaissances nouvelles acquises dans le domaine de la biosynthèse des porphyrines et de l'utilisation de techniques de laboratoire d'une grande sensibilité.

Le nombre relativement élevé des porphyrines présentes normalement ou anormalement dans les milieux biologiques soulève des difficultés de microanalyse encore accrues par les propriétés propres à ces molécules: instabilité, isomérisation, possibilité de formation de complexes moléculaires.

C'est pourquoi nous avons jugé utile de rappeler dans une première partie, des généralités se rapportant à la chimie et à la biosynthèse des porphyrines, aux porphyrines et porphyrinuries secondaires, et aux méthodes d'analyse conduisant aux résultats les plus satisfaisants.

Dans la deuxième partie sont exposées les techniques de recherche et dosage des porphyrines et de leurs précurseurs dans les milieux biologiques. Leur application à des urines de malades atteints de porphyrines permet la préparation d'esters octaméthylés cristallisés d'uroporphyrines que nous avons utilisé pour nos recherches personnelles.

La séparation quantitative des isomères I et III de l'uroporphyrine est l'élément de base pour la classification biochimique et clinique du défaut métabolique. Mais, rares sont les cas en pratique courante, où il est possible d'obtenir quelques milligrammes de substance pure, cristallisée, le plus souvent pour des raisons de faible teneur en uroporphyrines ou de prélèvement trop peu abondant. La longueur des opérations de purification n'apporte qu'une précision très relative dans les résultats de l'analyse.

Ces considérations justifient nos essais de séparation des isomères à partir de l'uroporphyrine acide libre, en faisant la part de l'erreur que peut apporter la présence d'autres porphyrines, heptacarboxyliques en particulier.

PREMIERE PARTIE

G E N E R A L I T E S

- I - Chimie des porphyrines.
- II - Propriétés physicochimiques des porphyrines.
- III - Coproporphyrines.
- IV - Uroporphyrines.
- V - Protoporphyrine.
- VI - Biosynthèse des porphyrines
- VII - Les porphyries :
 - VII-1 - Porphyrie érythropoiétique congénitale.
 - VII-2 - Protoporphyrine érythropoiétique
 - VII-3 - Porphyrie aiguë intermittente
 - VII-4 - Porphyrie génétique sud-africaine
 - VII-5 - Porphyries cutanées
- VIII - Les porphyrinuries secondaires
- IX - Recherche, dosage, séparation et identification des porphyrines et de leurs précurseurs dans les milieux biologiques :
 - IX-1 - Recherche et dosage des porphyrines et de leurs précurseurs dans l'urine.
 - IX-2 - Dosage des porphyrines dans les fécès.
 - IX-3 - Dosage des porphyrines dans les globules rouge et le plasma.

IX-4 - Recherche des porphyrines dans les autres prélèvements biologiques.

IX-5 - Séparation et identification des porphyrines des milieux biologiques :

IX-5-1 - Porphyrines libres.

IX-5-2 - Porphyrines estérifiées.

IX-5-3 - Identification des isomères des coproporphyrines et des uroporphyrines.

- X - Taux normaux des porphyrines dans les milieux biologiques.

- XI - Examens de laboratoire à pratiquer dans le diagnostic biochimique d'une porphyrie.

DEUXIEME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

I - Introduction

II - Techniques utilisées :

II-1 - Dosages des porphyrines et de leurs précurseurs dans l'urine.

II-2 - Dosages des porphyrines dans les fécès.

II-3 - Dosages des porphyrines dans les globules rouges et le plasma.

III - Préparation d'esters octaméthyliques d'uroporphyrines à partir des urines.

IV - Applications à des urines de porphyries : préparation d'étalons d'esters octaméthyliques d'uroporphyrines :

IV-1 - Porphyrie cutanée dite de l'adulte.

IV-2 - Porphyries aiguës intermittentes.

V - Méthodes de détermination quantitative des isomères I et III de l'uroporphyrine estérifiée :

V-1 - Point de fusion des esters méthyliques.

V-2 - Séparation qualitative et quantitative des isomères I et III de l'uroporphyrine estérifiée par chromatographie :

V-2.1 - Méthode de Falk et Benson.

V-2.2 - Méthode de Cornford et Benson.

VI - Choix d'une méthode de référence pour la détermination des isomères I et III de l'uroporphyrine estérifiée :

VI-1 - Méthode de Cornford et Benson

VI-2 - Résultats obtenus pour les étalons utilisés.

VII - Essais de séparation des isomères I et III de l'uroporphyrine libre par d'autres méthodes :

VII-1 -

VII-1.1. - Objet des recherches.

VII-1.2 - Etalons utilisés

VII-2 - Chromatographie avec la lutidine :

VII-2.1 - Chromatographie sur papier :

VII-2.1.1 - Conditions opératoires.

VII-2.1.2 - Influence de la nature de la lutidine sur le R_F des uroporphyrines libres.

VII-2.1.3 - Influence de la teneur en eau du solvant sur le R_F des uroporphyrines libres.

VII-2.1.4 - Influence de l'atmosphère d'ammoniaque sur le R_F des uroporphyrines libres.

VII-2.1.5 - Influence du pH du solvant sur le R_F des uroporphyrines libres.

VII-2.1.6 - Chromatographie descendante et horizontale.

VII-2.1.7 - Essais de chromatographie sur différents papiers.

VII-2.2 - Chromatographie sur couche mince.

VII-2.3 - Chromatographie sur d'autres supports.

VII-3 - Chromatographie avec d'autres solvants ; solvants :

VII-3.1 - Acétate d'éthyle.

VII-3.2 - Cyclohexanone.

VII-3.3 - Alcools.

VII-3.4 - Tampons tris hydroxyméthyl amino-méthane.

VII-4 - Chromatographie sur papiers échangeurs d'ions :

VII-4.1 - Papiers échangeurs de cations.

VII-4.2 - Papiers échangeurs d'anions.

VII-5 - Electrophorèse sur papier.

VIII - Discussion. Application de la méthode de Cornford et Benson aux prélèvements biologiques à faible teneur en uroporphyrines.

CONCLUSIONS

PREMIERE PARTIE

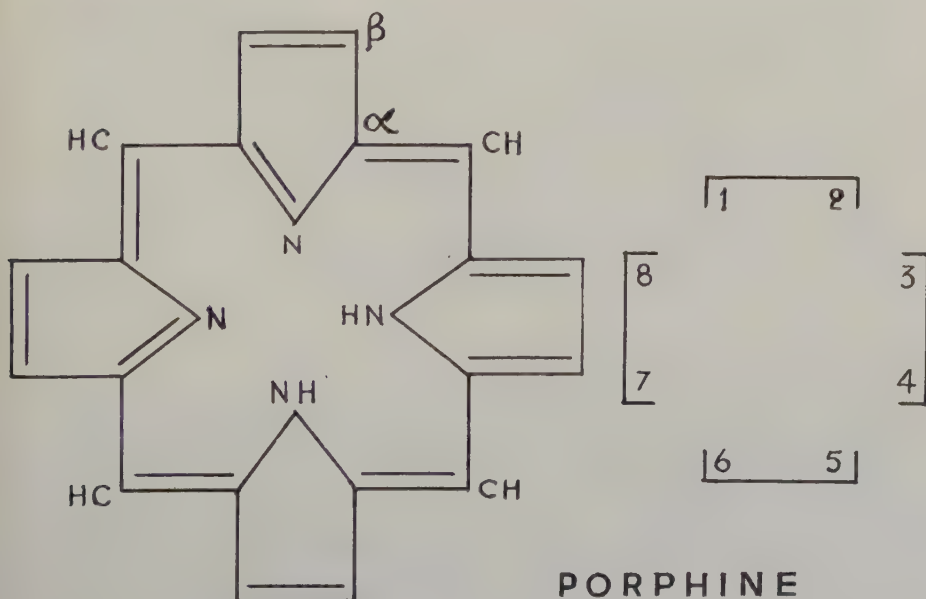
GENERALITES

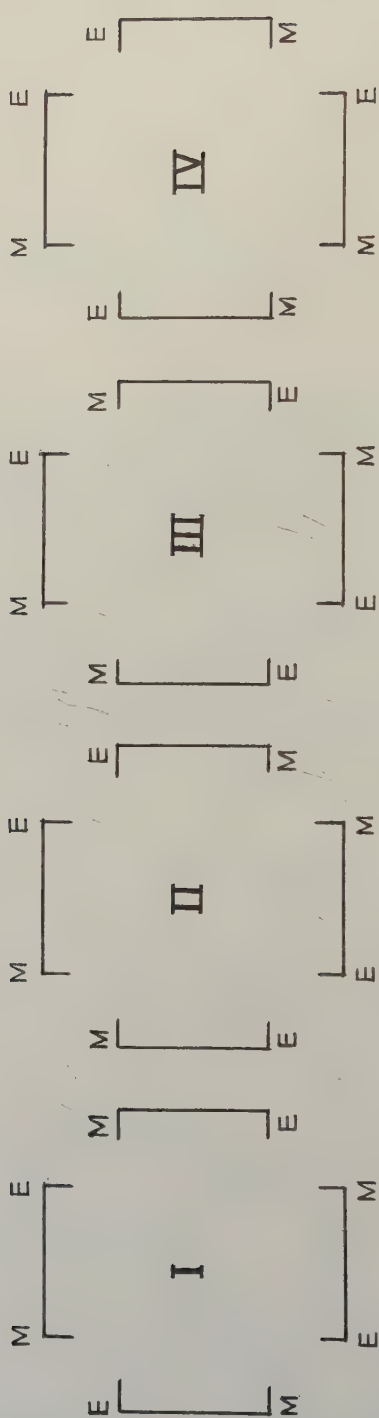
- I -

CHIMIE DES PORPHYRINES

Les porphyrines ont une grande importance en biologie puisqu'elles forment le groupement prosthétique de pigments respiratoires (hémoglobines, cytochromes,...) ou non respiratoires (chloroplastines...).

Elles dérivent toutes d'un cycle tétrapyrrolique fermé, la PORPHINE. Les quatre noyaux pyrroles sont unis entre eux par des groupements méthényles $-CH-$ fixés sur les carbones α , les carbones β restant libres, peuvent porter huit atomes d'hydrogène dont la substitution par des radicaux carbonés conduit aux porphyrines.





ETIOPORPHYRINE

- ISOMERIE DES PORPHYRINES -

Les porphyrines se rattachent à deux groupes, le groupe de l'Étioporphyrine et le groupe de la Mésoporphyrine.

- 1/. GROUPE DE L'ETIOPORPHYRINE

L'étioporphyrine est la tétraméthyl, tétraéthyl porphyrine. Dans la molécule, les carbones sont substitués par deux variétés de radicaux, méthyle et éthyle. Hans Fischer a préparé les quatre isomères possibles de cette série. Seuls les isomères I et III sont naturels, les isomères II et IV sont des produits de synthèse. C'est à ce groupe que se rattachent les uroporphyrines et les coproporphyrines.

- 2/. GROUPE DE LA MESOPORPHYRINE

La mésoporphyrine est la tétraméthyl, diéthyl, dipropanoïque porphine. A ce groupe se rattachent des porphyrines caractérisées par trois variétés de radicaux : les quatre carbones β portent toujours un groupement méthyle, les autres des substituants éthyle, vinyle, propanoïque ou un atome d'hydrogène. Hans Fischer a préparé à partir de la mésoporphyrine les quinze isomères possibles de ce groupe. S'y rattachent des composés naturels tels que la protoporphyrine, la deutéroporphyrine, l'hématoporphyrine. Lorsque l'on désigne la protoporphyrine par le symbole III 9, on indique une disposition des groupements méthyles en 1, 3, 5, 8 comme dans l'étioporphyrine III, les autres radicaux étant disposés comme dans la mésoporphyrine 9.

- 3/. On admet depuis les travaux de H. Fischer que les porphyrines naturelles étant du type I ou III, cette isomérisie est conservée tout au long de la vie de la molécule dans l'organisme, le passage d'un type isomérique à un autre nécessitant le remaniement complet de la structure.

- I I -

PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DES PORPHYRINES

La structure cristalline des porphyrines a été confirmée par l'analyse cristallographique aux rayons X. Les dimensions et la symétrie de la molécule sont en accord avec la nature cyclique du noyau bien établie par ses propriétés chimiques et par les chaleurs de combustion des porphyrines. Le noyau de porphine est un plan de 8,5-8,5 Å ayant une épaisseur de 4,7 Å. Les dimensions moléculaires de différentes porphyrines d'intérêt biologique sont connues (1).

La question de liaison hydrogène entre les atomes d'azote a été longuement discutée. Des travaux récents semblent prouver son existence.

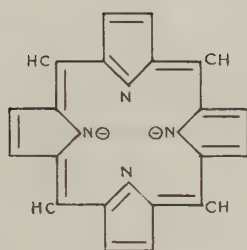
- PROPRIETES ACIDO-BASIQUES -

- a/. Ionisation du noyau azoté

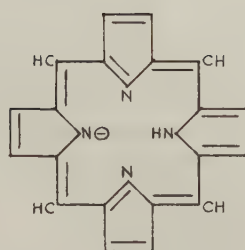
Le cycle tétrapyrrolique de la porphine peut être considéré comme un ampholyte potentiel tétravalent : - les deux atomes d'azote du type imino ($-N=$) sont susceptibles d'accepter des protons et donc d'exister comme centres basiques.

- les deux atomes d'azote du type pyrrole ($-NH=$) peuvent perdre ou accepter des protons et exister ainsi comme centre acides ou basiques.

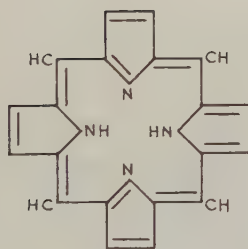
Les sept cas possibles sont réunis dans le tableau suivant (d'après Phillips, 2) :



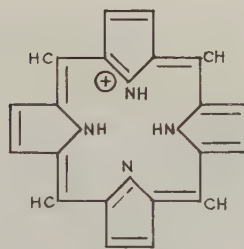
p^{2-}



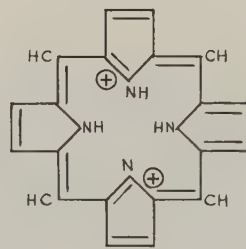
PH^{-}



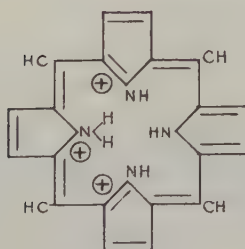
PH_2



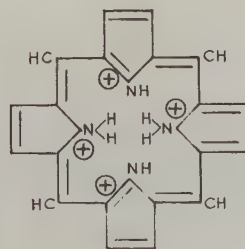
PH_3^{+}



PH_4^{2+}



PH_5^{3+}



PH_6^{4+}

Quatre de ces structures : PH_4^{2+} , PH_3^+ , PH_2 , P^{2-} , ont pu être observés par les spectres; la base libre (PH_2), le sel dicationique ($\text{PH}_4^{2+} \text{Cl}_2^{2-}$) et le sel dianionique ($\text{Na}_2^{2+} \text{P}^{2-}$) ont été isolés par voie chimique.

Plusieurs propositions ont été faites en vue d'assigner des valeurs pK aux noyaux porphyrines. La plus convenable consiste à exprimer l'équilibre acide-base dans les termes du logarithme négatif de la constante de dissociation acide et de rapporter les valeurs des pK dans l'ordre des valeurs positives décroissantes. Ceci indique d'une part que pK_1 et pK_2 sont en rapport avec l'équilibre acide dû à la dissociation des protons des atomes d'azote du type pyrrole, et, d'autre part, que pK_3 et pK_4 sont en rapport avec l'équilibre basique lié à la captation de protons par les atomes d'azote du type imino.

Les valeurs sont définies par :

$$\text{pK}_1 = \text{pH} - \log \frac{[\text{P}^{2-}]}{[\text{PH}^-]}$$

$$\text{pK}_2 = \text{pH} - \log \frac{[\text{PH}^-]}{[\text{PH}_2]}$$

$$\text{pK}_3 = \text{pH} - \log \frac{[\text{PH}_2]}{[\text{PH}^{3+}]}$$

$$\text{pK}_4 = \text{pH} - \log \frac{[\text{PH}_3^+]}{[\text{PH}_4^{2+}]}$$

Les porphyrines se comportent généralement comme des acides extrêmement faibles pK_1 et pK_2 ont été estimés de l'ordre de +16 dans le cas de l'étioporphyrine en ne tenant pas compte des chaînes latérales acides.

La basicité des porphyrines peut être démontrée rapidement par leur solubilité dans les acides minéraux dilués (environ 0,1 N) dans lesquels les structures dicationiques sont habituellement observées. En fait la plupart des études sur l'ionisation concernent la basicité du noyau.

- b/. Ionisation des chaînes latérales acides

Les porphyrines naturelles portent sur les carbones β des groupements acétiques ou propioniques qui conditionnent leur solubilité et leur coefficient de partage. Dans ces porphyrines polycarboxyliques les valeurs pK intrinsèques sont en rapport avec l'effet électrostatique dû à l'ionisation des groupements carboxyliques et des atomes d'azote cycliques. Par conséquent dans une zone de pH alcalin les valeurs pK moyennes de ces porphyrines atteindront une valeur limite, les groupements acides étant tous effectivement ionisés.

- SOLUBILITES -

- a/. Porphyrines libres

Les porphyrines libres étant ampholytes, sont solubles dans les solutions alcalines grâce à leurs groupements carboxyliques et dans les acides minéraux, grâce à leurs atomes d'azote cyclique. Les points isoélectriques se situent en général dans des limites de pH comprises entre 3 et 4,5 pour lesquelles elles peuvent précipiter de leurs solutions aqueuses.

Les porphyrines sont en général solubles dans l'acide acétique glacial, les acides minéraux forts, la pyridine, les solutions aqueuses de détergents anioniques, cationiques ou neutres. Nous verrons à propos de l'étude particulière de chacune des porphyrines, l'intérêt des solubilités respectives pour leur isolement en biologie.

Parmi les caractères de solubilité, deux notions sont essentielles :

- "le nombre pH", que l'on peut définir comme le pH d'une solution tampon qui extrait 50 p 100 d'une porphyrine à partir de 4 volumes de solution éthérée;

- "le nombre chlorhydrique" ou nombre de Willstätter, le plus habituellement utilisé. Il représente la

concentration de HCl en p. 100 (p/v) qui extrait d'un égal volume de solution étherée les deux tiers de la porphyrine.

Le nombre chlorhydrique dépend à la fois de la dissociation de la porphyrine comme base et du coefficient de distribution de la porphyrine libre et de son chlorhydrate entre l'eau et les solvants organiques. Les effets des chaînes latérales hydrophiles ($-\text{COOH}$; $-\text{CHOH}-\text{CH}_3$) diminuent de l'uroporphyrine à l'étioporphyrine. L'uroporphyrine est en effet la plus soluble dans l'eau.

Dans le tableau suivant sont réunis quelques nombres chlorhydriques utilisés couramment pour la séparation des mélanges de porphyrines :

	Nombres chlorhydriques	
	libre	ester méthylique
Coproporphyrine	0,08	1,5
Uroporphyrine	—	5,0
Deuteroporphyrine	0,3	2,0
Protoporphyrine	2,5	5,5

L'effet de différentes forces d'acides sur le coefficient de partage effectif éther-eau (K'_p) dans les conditions où le dication seulement est décelé en phase aqueuse, peut être calculé par la relation :

$$K'_p = \frac{K_p \cdot K_3 \cdot K_4}{[\text{H}^+]^2}$$

c'est-à-dire que K'_p est inversement proportionnel au carré de la concentration en protons. K_p est le coefficient de partage éther-eau calculé pour un certain nombre de porphyrines, sa valeur va de 10^4 à 10^7 . La relation précédente est utilisée pour calculer la concentration d'acide la plus convenable pour une séparation des porphyrines par contre-courant (3).

- b/. Esters des porphyrines

Les esters des porphyrines sont facilement préparés, cristallisent bien et sont utilisés pour la caractérisation de celles-ci, les esters méthyliques particulièrement.

Ils sont solubles dans les solvants organiques : ils sont en effet plus lipophiles que les porphyrines libres ainsi que l'indiquent les nombres chlorhydriques cités précédemment.

- PROPRIETES SPECTROSCOPIQUES -

- a/. Spectres d'absorption dans le visible et l'ultraviolet

Les pigments pyrroliques sont caractérisés par un spectre à 4 bandes dans la région visible (450 - 700 m μ) et un seul maximum (bande de Soret) dans le proche ultra-violet (entre 400 et 410 m μ). Les bandes visibles sont numérotées de I à IV à partir de la région rouge du spectre. L'intensité de la bande de Soret est une vingtaine de fois plus forte que celle de la bande visible la plus importante. C'est sur cette propriété que repose le dosage des porphyrines dans les milieux biologiques en particulier. La position de la bande de Soret est la même pour les différents isomères d'une porphyrine.

D'après l'intensité relative des bandes d'absorption dans le visible, les porphyrines ont été classées en quatre groupes. Uro-, copro-, proto-, deutéro-, et hématoporphyrine appartiennent au groupe type "Etio" dans lequel l'intensité relative des bandes diminue dans l'ordre IV > III > II > I.

Les complexes métalloporphyriniques possèdent seulement deux bandes d'absorption dans la région visible : une bande α (la plus proche du rouge) et une bande β . La bande de Soret (bande γ) étant toujours située aux environs de 400 m μ . Ce type de spectre se retrouve

dans certaines urines de porphyrines où l'uroporphyrine est éliminée sous forme de complexe métalloporphyrinique, l'acidification par un acide minéral fait apparaître le spectre à quatre bandes.

Les bandes d'absorption des porphyrines en solution chlorhydrique sont déplacées vers les plus grandes longueurs d'onde lorsque la concentration en acide chlorhydrique augmente. On note aussi des variations des coefficients d'extinction. Il convient donc dans l'analyse spectrométrique des porphyrines de tenir compte de la concentration en acide utilisée pour la position de la bande de Soret d'une part et pour l'extinction d'autre part.

- b/. Spectres d'absorption dans l'infra-rouge

Au même titre que la spectrographie dans le visible, la spectrographie dans l'infra-rouge est susceptible d'apporter des renseignements importants quant à la structure des porphyrines et leur caractérisation. Dans certains cas particuliers, elle permet l'identification des isomères de position. Cependant, la nécessité d'opérer avec des échantillons d'une grande pureté limite les applications de la spectrographie infra-rouge.

- c/. Spectres de fluorescence

Par irradiation avec une lumière aux environs de $400\text{ m}\mu$ (lumière ultra-violette filtrée à travers un filtre de Wood) les solutions de porphyrines libres, de leurs sels et de leurs esters, présentent une intense fluorescence rouge ou orangée caractéristique. Cette fluorescence peut être décelée par l'oeil pour des concentrations de 10^{-8} M et photométriquement pour des concentrations inférieures à 10^{-10} M . Cette fluorescence n'existe pas en général pour les complexes métalliques à l'exception des complexes zinciques, cadmiques, magnésiens et plombiques. C'est pour cette raison qu'il n'est pas possible de détecter l'hémoglobine par fluorescence.

Cette fluorescence est mieux observée en solution chlorhydrique. Toutefois son intensité est sous

la dépendance de plusieurs facteurs, en particulier, la nature du solvant, la température, le pH, la concentration en électrolytes ou en pigments naturels parasites, qui, dans certains cas, peuvent conduire à une inhibition partielle ou totale du phénomène.

Les spectres de fluorescence correspondent aux spectres d'absorption dans les régions de la bande de Soret et le visible. Ils sont identiques dans les mêmes conditions de solvants pour les porphyrines libres et leurs esters. De même, les isomères des porphyrines ont des spectres similaires quoique l'intensité de la fluorescence puisse varier dans certaines conditions de pH.

L'utilisation de la fluorométrie à des fins quantitatives doit être abordée dans des conditions expérimentales extrêmement précises en raison de l'inhibition possible. Elle est complémentaire de la spectrométrie d'absorption parce qu'elle permet l'accès à des concentrations beaucoup plus faibles.

- III -

C O P R O P O R P H Y R I N E S

Tétraméthyl, tétrapropanoïque porphine $C_{36}H_{38}O_8N_4 = 654,73$.

Coproporphyrine I :

tétraméthyl 1,3,5,7, tétrapropanoïque 2,4,6,8,porphine.

Coproporphyrine III :

tétraméthyl 1,3,5,8, tétrapropanoïque 2,4,6,7,porphine.

- Solubilités des coproporphyrines libres :

- Solubles dans : éther éthylique, acide acétique, acétate d'éthyle, alcool butylique.
- Peu solubles dans : chloroforme.
- Insolubles dans : éther de pétrole.

- Nombres chlorhydriques :

- Coproporphyrines libres : HCl 0,08 p 100.
- Esters tétraméthyliques : HCl 1,50 p 100.

- Spectres d'absorption dans le visible :

- Coproporphyrines libres dans HCl à 25 p 100 :
405-550, 5-574-593 m μ .
- Esters tétraméthyliques dans le chloroforme :
400-498-532-566-594-621 m μ .

- Coefficients d'extinction de la bande de

Soret :

d'après Rimington (4), Rimington et Sveinson (5) et With (6).

-- Coproporphyrines libres dans HCl 0,1 N, à 399,5 m μ :

$$10^{-3} E_{1\text{cm}}^{1\%} = 7,47$$

$$10^{-5} \xi_M = 4,89$$

-- Esters tétraméthyliques dans le chloroforme, à 399,5 m :

$$10^{-3} E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2,53$$

$$10^{-5} \xi_M = 1,80$$

-- Spectres de fluorescence :

-- Coproporphyrines libres dans HCl 2 N :
595-618-652 m μ .

-- Esters tétraméthyliques dans les solvants organiques :
597-623-654-671-691 m μ .

-- Points de fusion des esters :

-- Coproporphyrine I, ester tétraméthylique : 250-251° C.

-- Coproporphyrine III, ester tétraméthylique : P.F. double
160 et 178° C.

- I V -

UROPORPHYRINES

Tétracétyl, tétrapropanoïque porphine $C_{40}H_{38}O_{16}N_4 = 830,78$

Uroporphyrine I :

tétracétyl 1,3,5,7, tétrapropanoïque 2,4,6,8,porphine.

Uroporphyrine III :

tétracétyl 1,3,5,8, tétrapropanoïque 2,4,6,7,porphine.

- Solubilités des uroporphyrines libres :

- Isomère I et III : solubles dans acétate d'éthyle, alcool butylique, cyclohexanone à pH 1,5-1,8.

insolubles dans : éther, chloroforme, éther de pétrole.

- Isomère I : insoluble dans : acide acétique glacial, pyridine.

- Isomère III : soluble dans : acide acétique glacial, pyridine.

- Nombres chlorhydriques :

- Esters octaméthyliques : HCl 5 p 100.

- Spectres d'absorption dans le visible :

- Uroporphyrines libres dans HCl à 25 p 100:

410,5-553,5-577-597 m μ .

- Uroporphyrines libres dans HCl 0,5 N :

405,5-552-594 m μ .

- Esters octaméthyliques dans le chloroforme :
406-502-536-572-627 m μ .

Soret : -- Coefficients d'extinction de la bande de

d'après Rimington(4), Rimington et Sveinson (5) et With (6).

- Uroporphyrines libres dans HCl 0,5 N, à 405,5 m μ :

$$10^{-3} E_{1\text{cm}}^{1\%} = 6,36$$

$$10^{-5} \epsilon_M = 5,28$$

- Esters octaméthyliques dans le chloroforme , à 405,5 m μ :

$$10^{-3} E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2,30$$

$$10^{-5} \epsilon_M = 2,17$$

- Spectres de fluorescence :

- Uroporphyrines libres dans HCl 2 N :
596-619-653 m μ .

- Esters octaméthylique dans les solvants organiques :
600-626-658-676-695,5 m μ .

- Points de fusion des esters :

- Uroporphyrine I, ester octaméthylique : 290-293° C.
 - Uroporphyrine III, ester octaméthylique : 225 ?,
260-264° C.
-

- V -

PROTOPORPHYRINE III 9

Tétraméthyl 1,3,5,8,divinyl 2,4, dipropanoïque 6,7, porphine. $C_{34}H_{34}O_4N_4 = 562$.

- Solubilité de la protoporphyrine libre :

- Soluble dans : éther, acide acétique, chloroforme, alcool butylique, acétate d'éthyle.
- Peu soluble dans : éther de pétrole.

- Nombres chlorhydriques :

- Protoporphyrine libre : HCl 2,5 p 100.
- Ester diméthylque : HCl 5,5 p 100.

- Spectres d'absorption dans le visible :

- Protoporphyrine libre dans HCl à 25 p 100 :
411-502-557,2-582-602,5 m μ .
- Ester diméthylque dans le chloroforme :
407,5-499,1-532,9-567,7-678,2-696,7-622,5 m μ

- Coefficients d'extinction de la bande de Soret :

d'après Rimington (4), Rimington et Sveinson (5) et With (6).

- Protoporphyrine libre dans HCl 1,37 N, à 408 m μ :

$$10^{-3} E_{1\text{cm}}^{1\%} = 4,67$$

$$10^{-5} \epsilon_M = 2,62$$

- Ester diméthylque dans le chloroforme, à 407,8 m :

$$10^{-3} E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2,89$$

$$10^{-5} \epsilon_M = 1,71$$

- Spectres de fluorescence :

- Protoporphyrine libre dans HCl 2 N :

604-626-655 m μ .

- Ester diméthylque dans les solvants organiques :

606-632,5-669,5-703,5 m μ .

- Point de fusion de l'ester diméthylque :

222-223° C.

- VI -

BIOSYNTHESE DES
PORPHYRINES

L'organisme renferme plusieurs grammes de porphyrines à l'état libre ou liées sous forme de chromoprotéides, dont la plus grande partie est produite par synthèse.

L'étape initiale de cette biosynthèse a été définitivement établie grâce aux travaux de Shemin et ses collaborateurs, Rittenberg et Bloch, Rimington et ses collaborateurs, Neuberger et ses collaborateurs. Ils ont pu en effet démontrer chez l'homme et chez l'animal, en utilisant des molécules marquées à l'azote lourd et au carbone 14, que l'acide acétique et la glycine constituent les deux seuls éléments de départ.

La formation d'une molécule de porphine nécessite la présence de 8 molécules de glycine dont 4 atomes d'azote seulement sont utilisés pour l'élaboration des noyaux pyrroliques. L'emploi de la glycine marquée par le carbone 14 sur son carbone en α a permis de mettre en évidence que ces 8 atomes de carbone se retrouvent répartis entre 4 carbones α des noyaux pyrrole et les carbones des ponts méthéniques.

Le rôle de l'acide acétique a été élucidé par l'étude de la biosynthèse de la protoporphyrine. Les carbones des groupements méthyles sont retrouvés dans 4 carbones β du noyau de la porphine, les carbones des restes méthyles et vinyles et les carbones C_1 et C_2 des restes propanoïques. Les autres carbones du cycle, c'est à-dire 4 carbones α , 4 carbones β et le carbone carboxylique du reste propanoïque, ont une origine mixte ; ils dérivent à la fois du groupement méthyle et du

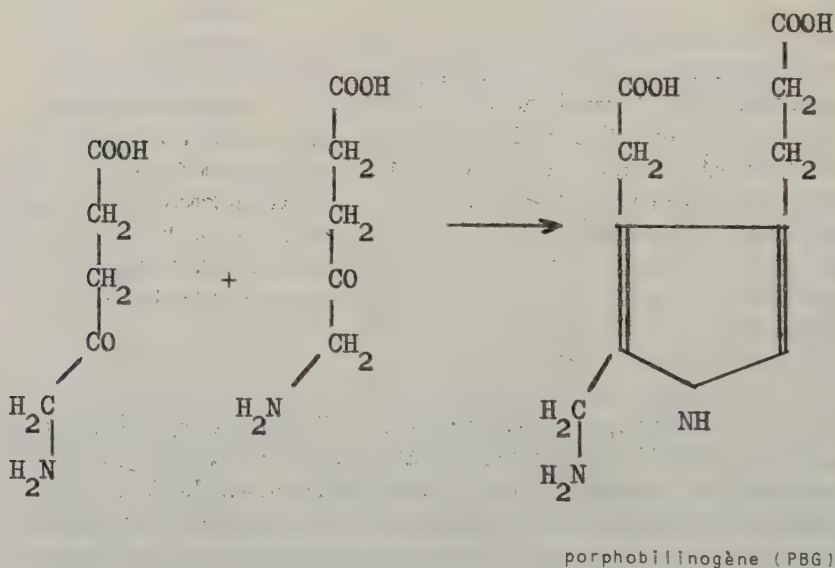
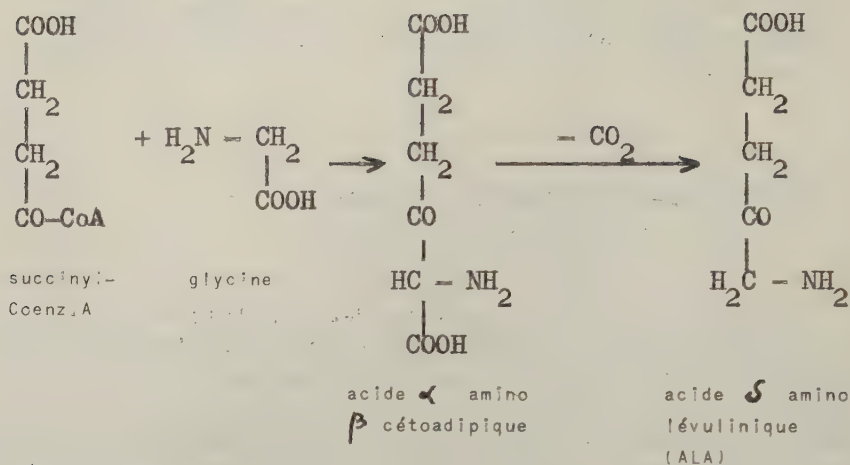
groupement carboxylique de l'acide acétique. Enfin, un tiers des atomes d'hydrogène du cycle a pour origine l'acide acétique ainsi qu'on a pu le vérifier avec le deutéroacétate.

- BIOSYNTHESE DU PORPHOBILINOGENE -

Les porphyrines procèdent en fait de la fusion de quatre noyaux monopyrroliques primitifs formés à partir de l'acide acétique et de la glycine.

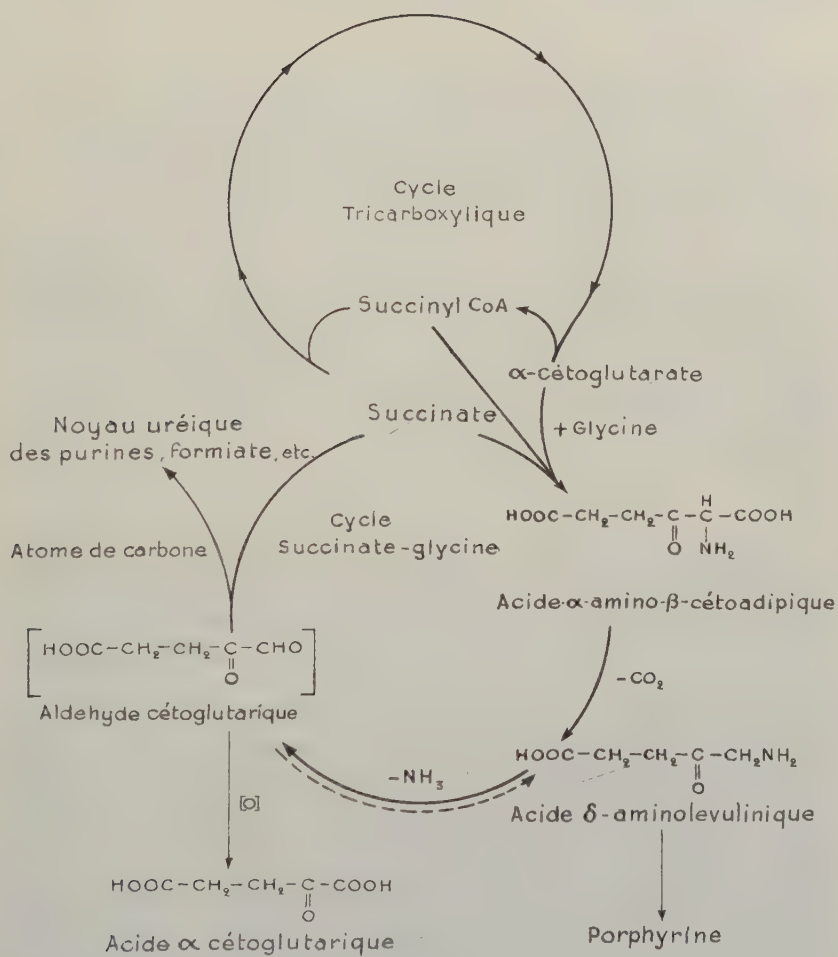
L'acide acétique par l'intermédiaire du cycle de Krebs, intervient sous forme d'acide succinique qui, à l'état de succinyl-coenzyme A peut réagir avec la glycine. Le pyridoxal-phosphate est le cofacteur de l'enzyme condensant qui catalyse cette réaction. La condensation équimoléculaire succinyl-coenzyme A-glycine aboutit à la formation d'une molécule d'acide α amino β céto adipique. Cet acide conduit par décarboxylation à l'acide β aminolévulinique (ALA), intermédiaire métabolique partiellement éliminé à l'état normal en faible quantité dans les urines. Cette étape de la biosynthèse se situe au carrefour du cycle de Krebs, du métabolisme des aminoacides et de la biosynthèse des porphyrines. (Shemin 7 - voir page 23).

L'étape suivante de la biosynthèse a lieu sous le contrôle d'un enzyme, la ALA déshydrase, grâce auquel se fait la condensation de deux molécules de ALA pour former une molécule de porphobilinogène (PBG). Cependant une faible partie de ALA dont on ne connaît pas l'importance exacte, échappe à cette voie métabolique. En effet, des travaux récents ont montré que ALA pouvait être la source d'un certain nombre d'atomes de carbone dans la biosynthèse des bases puriques et pyrimidiques par des voies non encore élucidées.



BIOSYNTHESE DE L'UROPORPHYRINE -

Le PBG constitue donc le noyau monopyrrolique primitif qui par condensation fournit le cycle tétrapyrrolique de la porphine. Il s'agit ici d'une des phases les plus complexes du métabolisme des porphyrines.



(d'après SHEMIN D.)

Des études *in vitro* ont montré que deux enzymes interviennent dans cette réaction (8) :

- l'Uroporphyrinogène I synthétase (ou Porphobilinogène désaminase), qui catalyse la production de l'Uroporphyrinogène I;

- l'Uroporphyrinogène III cosynthétase (ou Isomérase de Bogorad). Ce second enzyme est inactif lorsqu'il est incubé seul avec PBG. La présence simultanée de l'Uroporphyrinogène I synthétase est indispensable à la production d'Uroporphyrinogène III.

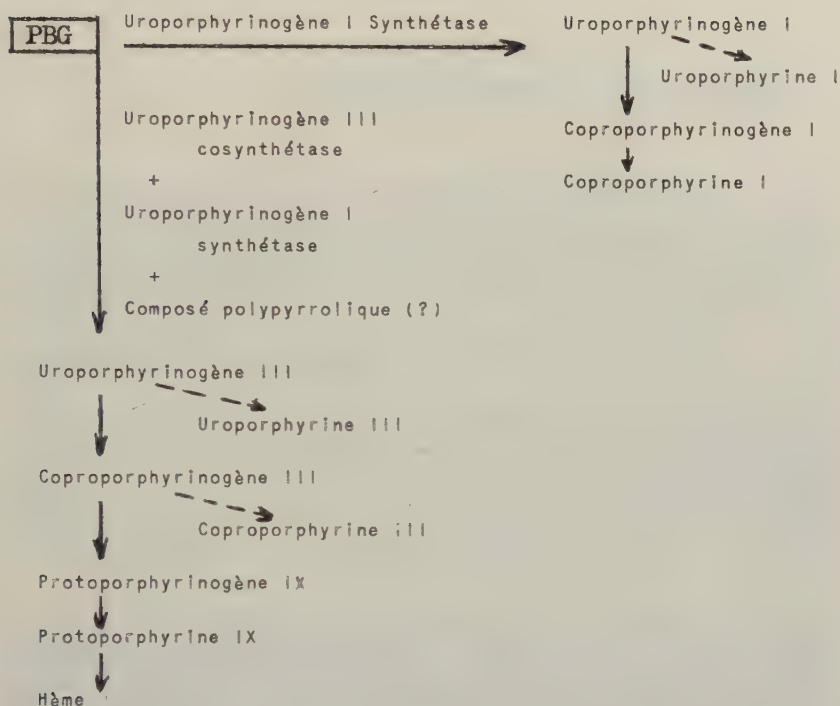
Un certain nombre de composés se conduisent comme des inhibiteurs de cette réaction : le formaldéhyde, les ions Ag^+ , Hg^{2+} , le parachloromercurobenzoate, mais surtout, les ions NH_4^+ , l'hydroxylamine et le dipyrrométhane. La présence de ces corps produit en effet une accumulation des composés intermédiaires entre le PBG et l'Uroporphyrinogène I.

Il est possible de concevoir la formation de l'Uroporphyrinogène I à partir de 4 molécules de PBG par condensation "bout à bout" avec élimination de NH_3 . Celle de l'Uroporphyrinogène III est plus difficilement explicable en raison d'une disposition différente des restes acétiques et propanoïques sur un noyau pyrrole de l'Uroporphyrine III. Plusieurs hypothèses ont été proposées à ce sujet. La présence simultanée d'Uroporphyrinogène I synthétase et d'Uroporphyrinogène III cosynthétase étant nécessaire *in vitro* pour former l'Uroporphyrinogène III à partir de PBG, il semblerait probable que l'Uroporphyrinogène III cosynthétase requiert pour former l'Uroporphyrinogène III la présence de 2 substrats, l'un étant PBG lui-même, l'autre, un produit polypyrrolique non isolé résultant de l'action de l'Uroporphyrinogène I synthétase sur PBG (8,9).

La destinée métabolique des Uroporphyrinogènes I et III se poursuit selon 2 voies : - une voie principale, la formation des coproporphyrinogènes I et III,

- une voie secondaire, la formation d'Uroporphyrines I et III, qui en constituent les produits terminaux.

- BIOSYNTHESE DE L'HEME -



Les Uroporphyrinogènes I et III vont subir l'action d'un même enzyme, l'Uroporphyrinogène décarboxylase. Par décarboxylation, l'Uroporphyrinogène III aboutit à la formation de Coproporphyrinogène III, qui, à son tour subit une décarboxylation oxydative (Coproporphyrinogène décarboxylase) et fournit le Protoporphyrinogène IX. Les isomères I n'interviennent pas dans cette synthèse. En effet l'Uroporphyrinogène I conduit au Coproporphyrinogène I qui se transforme en Coproporphyrine I.

La décarboxylation in vitro et probablement in vivo de l'Uroporphyrinogène I et de l'Uroporphyrinogène III s'accompagne de la formation de porphyrines à 7,8,5 groupements carboxyliques.

De plus, in vivo, une partie du Coproporphyrinogène III échappe à la synthèse de l'hème sous forme de Coproporphyrine III.

Le Protoporphyrinogène IX est à son tour oxydé en Protoporphyrine IX qu'un enzyme rend capable de fixer un atome de fer pour constituer l'Hème.

- LIEU DE FORMATION DES PORPHYRINES -

Du fait de l'importance de la Protoporphyrine dans la charge hémoglobinique de l'hématie, la formation des porphyrines a surtout été considérée au départ comme étant localisée dans les organes hématopoïétiques.

Au cours de l'évolution des connaissances biochimiques concernant les altérations relevées dans les diverses porphyries, cette notion a été revue sous le double aspect d'un désordre intéressant la moelle osseuse pour les porphyries érythropoïétiques ou d'un désordre intéressant le foie pour les porphyries hépatiques, selon le lieu de plus fortes concentrations des porphyrines et de leurs précurseurs.

Des expériences in vivo et surtout in vitro ont montré que les globules rouges circulants sont susceptibles, dans certaines conditions, de réaliser la synthèse de la protoporphyrine, leur activité paraissant en rapport avec le nombre des réticulocytes. De même, différents tissus sont capables de condenser ALA en PBG (foie, rein, poumon, testicule).

Il ne semble pas possible actuellement "d'assigner à tel ou tel organe un rôle prédominant dans l'élaboration des porphyrines. Il est vraisemblable au contraire, que les systèmes enzymatiques intéressés sont largement répandus dans tout l'organisme" (Bénard, Gajdos et Gajdos, Torok) (10).

- VII -

LES PORPHYRIES

Les porphyries constituent un groupe d'affections caractérisées cliniquement par des signes cutanés, nerveux, abdominaux ou mixtes, dont l'origine réside dans un trouble du métabolisme des composés pyrroliques conduisant à la synthèse de la protoporphyrine.

Les signes biochimiques se caractérisent par l'accumulation et l'élimination à des taux anormaux des isomères I et III de l'uroporphyrine et aussi des précurseurs biogénétiques de ces derniers, l'acide *S* aminolévulinique et le porphobilinogène.

Nous verrons cependant qu'à la suite de la description de troubles très rares de la porphyrinogénèse, le terme de porphyrie doit être étendu à des perturbations métaboliques ne concernant plus uniquement l'uroporphyrine.

C'est vers la fin du XIX^e siècle qu'ont été rapportés les premiers cas dits d'hématoporphyrinuries. Garrod les classa au début du XX^e siècle dans les "Inborn errors of metabolism". Les vues initiales de Gunther et d'autres cliniciens devaient prendre un essor considérable grâce aux travaux de Hans Fischer qui établit dès 1915 à la fois la structure chimique de base du pigment en cause dérivant d'un noyau jusqu'ici inconnu, la porphine, et la structure véritable de ce pigment, l'uroporphyrine, et non pas l'hématoporphyrine ou d'autres pigments dérivés de l'hématine ainsi qu'on l'avait pensé alors. H. Fischer et son école préparèrent de plus la plupart des composés pyrroliques intéressant le métabolisme de l'hémoglobine. Ces acquisitions sont d'un intérêt fondamental dans la compréhension de la biochimie des porphyries.

LA CLASSIFICATION des porphyries primitive-
ment proposée par Gunther en 1922, d'où se détachait
clairement la porphyrie congénitale qui porte son nom,
devait être reprise après d'autres auteurs par Walden-
ström en 1937.

Waldenström distinguait :

- la porphyrie congé-
nitale ou maladie de Gunther,
- la porphyrie aiguë
à forme abdominale, nerveuse ou latente,
- la porphyrie cuta-
née tardive.

Cette classification a été une mise au point
indispensable à une époque où les techniques d'analyse
ne permettaient qu'une approche relativement grossière
de la nature véritable des lésions biochimiques. En ef-
fet, dès 1950, tout particulièrement avec le développe-
ment de la chromatographie sur papier, il devint néces-
saire d'envisager une répartition nouvelle des diffé-
rents aspects cliniques et biologiques des porphyries.
Mise à part la porphyrie congénitale qui conserve tou-
jours une physionomie particulière, il était apparu que
certains syndromes abdominaux ou neurologiques pouvaient
se compliquer de troubles cutanés. Ces considérations
semblaient déjà ressortir de certaines descriptions tel-
les que la porphyria cutanea de Waldenström. C'est seu-
lement à la suite d'une décantation effectuée parmi les
très nombreux travaux cliniques et chimiques publiés
que l'on s'aperçut que le problème des porphyries était
infiniment plus complexe que le laissait pressentir la
classification de Waldenström. Si le facteur génétique
a pu être clairement démontré dans certains cas, il n'en
reste pas moins vrai que les variantes dans les manifes-
tations cliniques au sein d'une même famille, certains
antécédents hépatiques ou toxiques, ont apporté aussi
des raisons de confusion dans la notion de porphyrie.

Il est très difficile actuellement de propo-
ser une classification satisfaisante des porphyries, né-
anmoins, on peut nettement distinguer deux groupes de
base :

- les porphyries érythropoïétiques, dans lesquelles l'anomalie métabolique siège au niveau des cellules immatures de la moelle osseuse,

- les porphyries hépatiques, dans lesquelles ces désordres médullaires de la biosynthèse de l'hème n'existent pas, mais où le foie est trouvé riche en porphyrines et en leurs précurseurs.

La Conférence Internationale de Capetown sur les Porphyries de septembre 1963, a tenu compte de ces considérations et proposé une classification et une terminologie qui paraissent pour l'instant les plus satisfaisantes (11). Elles seront probablement appelées dans l'avenir à subir quelques modifications.

- Porphyries érythropoïétiques :

VII-1 - Porphyrie érythropoïétique congénitale

VII-2 - Protoporphyrine érythropoïétique.

- Porphyries hépatiques :

VII-3 - Porphyrie aiguë intermittente (ou Pyroloporphyrie, Porphyrie génétique suédoise)

VII-4 - Porphyrie génétique Sud-Africaine (ou Protocoprotoporphyrine, Porphyria variegata, Porphyria cutanea tarda hereditaria, Porphyrie mixte)

VII-5 - Porphyries cutanées :

- Type héréditaire

- Type à prédisposition génétique possible associée à l'alcoolisme (Porphyria cutanea tarda symptomatica)

- Type acquis (Porphyries induites par l'hexachlorobenzène ou d'autres causes).

VII-1 -- PORPHYRIE ERYTHROPOIETIQUE CONGÉNITALE

OU MALADIE DE GUNTHER

La Porphyrie Erythropoïétique Congénitale est une affection très rare dont environ une centaine de cas certains ont été rapportés jusqu'ici dans la littérature mondiale. Le malade étudié par Hans Fischer, nommé Pétry, est le plus célèbre puisqu'il lui a permis d'établir la structure des porphyrines.

La maladie de Gunther se signale dès l'enfance typiquement par un syndrome cutané prenant la forme d'une éruption bulleuse de photosensibilisation localisée aux parties découvertes. L'évolution se fait par poussées rythmiques, particulièrement en période chaude. Ce trouble cutané s'accompagne fréquemment d'une pigmentation brune des téguments, d'hypertrichose et d'érythrodontie. Il n'y a jamais de signes neurologiques ou abdominaux. Plusieurs auteurs ont noté la fréquence d'une anémie hémolytique.

L'évolution de la maladie cutanée elle-même ne met pas en danger la vie du malade. Cependant, l'éruption par sa tendance nécrotique et mutilante détermine fréquemment des pertes de substance au niveau des oreilles, du nez et des mains. La plupart des malades meurent jeunes. Ce sont en effet des malades fragiles succombant en général à une affection intercurrente.

Un nombre relativement restreint d'études de cette affection sur le plan familial a pu être réalisé avec précision. Elle se révèle avoir un caractère congénital transmis suivant le mode récessif.

LE TRAITEMENT se borne à une protection de la peau par des crèmes au salicylate de méthyle ou d'amyle ou à l'oxyde de zinc ou de titane. Dans certains cas la splénectomie a entraîné une amélioration des signes cutanés et de l'anémie hémolytique.

LE DEFAUT BIOCHIMIQUE paraît résider dans le système hématopoïétique. Selon Rimington il correspondrait à l'absence de l'uroporphyrinogène isomérase. Cet enzyme n'est pas retrouvé dans les érythrocytes adultes circulants des malades et cette carence induit une production anormale de porphyrines du type I qui s'accumulent dans tous les tissus de l'organisme particulièrement au niveau des os, de la moelle osseuse et du foie.

L'ELIMINATION DES PORPHYRINES se fait par les urines et par les fecès.

LES URINES présentent une coloration allant du rouge au brun noir. Elles sont fluorescentes en lumière de Wood. L'examen spectroscopique révèle la présence du spectre à quatre bandes des porphyrines libres. Le taux de porphyrines retrouvées est énorme : il peut atteindre parfois 100 mg par 24 heures et même plus. L'élimination urinaire porte d'une manière presque exclusive sur l'uroporphyrine I mais on sait maintenant que l'on trouve aussi de faibles quantités d'uroporphyrine III. Rimington et Miles (12) ont identifié de plus des porphyrines à 5, 6 et 7 groupements carboxyliques. Les taux de porphobilinogène et d'acide δ aminolévulinique sont normaux. L'élimination des coproporphyrines I et III est relativement peu augmentée en regard de celle des uroporphyrines.

LES SELLES ont une fluorescence rouge et contiennent des taux normaux ou légèrement augmentés de protoporphyrine. L'élimination par contre de coproporphyrine I et surtout, d'uroporphyrine I est élevée.

Enfin, l'uroporphyrine se retrouve à des taux anormalement hauts dans les érythrocytes du sang circulant et de la moelle, le plasma et la bile (13, 14).

VII-2 - PROTOPORPHYRIE ERYTHROPOIETIQUE -

Cette affection a été tout d'abord étudiée par Magnus et ses Collaborateurs (15). D'autres cas ont

été rapportés depuis (16, 17). Elle se signale par une photosensibilité prenant l'aspect d'un érythème pouvant être créé par des radiations ultraviolettes de 400-410 m μ .

LES SIGNES BIOCHIMIQUES sont les suivants :

- **URINE** : les taux de porphobilinogène, d'acide δ aminolévulinique, de coproporphyrines et d'uroporphyrines, sont normaux.

- **SELLES ET GLOBULES ROUGES** : forte augmentation constante de coproporphyrines et protoporphyrine.

- **PLASMA** : présence de protoporphyrine au cours des crises.

On ne connaît pas actuellement la nature du désordre biochimique : il ne semble pas résider dans un trouble enzymatique des globules rouges ou une production anormale de protoporphyrine. Le caractère génétique éventuel de cette porphyrie reste à démontrer.

Il a été signalé récemment que l'inosine serait un traitement intéressant (18).

VII-3 - PORPHYRIE AIGUE INTERMITTENTE -

ou Porphyrie aiguë, Porphyrie "type Suédois", Pyrroloporphyrie.

Cette porphyrie a été particulièrement étudiée par Waldenström (19). La dénomination de porphyrie aiguë intermittente est en fait incorrecte puisqu'il s'agit d'une affection marquée des phases d'exacerbation soudaine de durée plus ou moins longue, séparées par des périodes de rémission au cours desquelles les signes cliniques sont absents. Il convient aussi de distinguer une forme latente de la maladie, décelable chez le porteur apparemment sain par les seuls stigmates biochimiques urinaires.

La symptomatologie clinique de la crise de porphyrie aiguë, très polymorphe et souvent déroutante, l'existence possible d'une forme latente chez les membres d'une même famille, rendent le diagnostic difficile et justifient l'intérêt qui s'attache à un dépistage biochimique précis.

LE TABLEAU CLINIQUE de l'attaque de porphyrie aiguë peut se caractériser par un syndrome uniquement abdominal ou neurologique, mais dans la plupart des cas, ces deux syndromes sont présents simultanément ou se succèdent. Fréquemment, apparaissent des troubles psychiques. Il n'y a jamais de signes cutanés.

Les douleurs abdominales modérées ou sévères, à forme de coliques localisées ou non, simulent assez bien l'appendicite, l'occlusion aiguë, les coliques hépatiques ou néphrétiques, l'ulcère perforé et la pancréatite aiguë.

Les manifestations nerveuses peuvent prendre quatre formes : - périphérique avec douleurs des membres, paralysie flasque, paralysie des muscles de l'abdomen et du tronc,

- bulbaire, sévère, nécessitant une assistance respiratoire,

- psychique, pouvant conduire à un diagnostic de schizophrénie ou d'état névrotique ou dépressif,

- troubles du système nerveux autonome avec hypertension habituellement marquée.

On peut noter aussi de l'oligurie, une fièvre modérée et une légère leucocytose.

La crise de porphyrie aiguë apparaît en général chez l'adulte entre 20 et 40 ans. De même que en ce qui concerne la forme latente, elle peut être provoquée par l'administration de certains médicaments (barbituriques, sulfamides, anesthésiques généraux, sulfonals, sédormid...) bien que ces stimuli ne soient pas des facteurs obligatoires.

La forme neurologique de la crise est la plus grave mais n'est pas forcément fatale et les symptômes peuvent disparaître en un temps plus ou moins long.

La porphyrie intermittente aiguë est une maladie génétique transmise selon un mode mendélien dominant.

LA THERAPEUTIQUE est assez indécise. On a préconisé l'administration de vitamines du groupe B associées aux extraits de foie. Il semble que dans certains cas l'administration d'E.D.T.A. ou de B.A.L. ait apporté quelque amélioration. Cependant, parmi les traitements proposés, l'acide adénosine 5 monophosphorique aurait l'action la plus favorable sur l'évolution de la crise (20, 21).

LE SYNDROME BIOCHIMIQUE est caractérisé essentiellement par une élimination URINAIRE abondante et porphobilinogène et d'acide δ aminolévulinique. L'uroporphyrine peut être présente en petite quantité souvent sous forme de son complexe zincique (spectre à 2 bandes). L'urine est de coloration normale à l'émission ou parfois rouge en raison de la transformation des précurseurs en porphyrines. Cette transformation peut en effet avoir lieu dans la vessie, par exposition de l'urine à la lumière, par acidification, chauffage ou action d'un oxydant. Selon le processus qui conduit à la formation d'uroporphyrines le pourcentage des isomères I et III déterminé pourra être variable. C'est à Waldenström que l'on doit la notion de la présence dans les urines de porphyries aiguës d'uroporphyrine III accompagnée de faibles quantités d'uroporphyrine I. Cette association dite "porphyrine de Waldenström" avait été primitivement identifiée par Waldenström (22) et Mertens (23) à l'uroporphyrine III. Mais en 1945, Grinstein (24) et Watson (25) l'identifièrent à une combinaison d'uroporphyrine I et d'une porphyrine heptacarboxylique du type III. C'est Rimington (26) qui montra qu'il s'agissait en fait d'un mélange d'uroporphyrine III et d'uroporphyrine I en faibles quantités (15 à 25 %). Le fait que l'on assiste dans cette affection à une élimination prédominante de porphobilinogène et d'acide δ aminolévulinique pourrait presque faire considérer l'uroporphy-

rine caractérisée à partir d'une urine incolore comme un artefact de laboratoire.

La coproporphyrine est en général modérée à part quelques exceptions.

Dans les **FECES** on ne trouve pas ou seulement une légère augmentation des taux d'uro-, copro- et proporphyrine.

Dans le **FOIE**, et ceci est un trait caractéristique de la maladie, les taux de porphobilinogène et des autres précurseurs sont élevés, alors qu'il existe très peu d'uroporphyrine préformée.

Dans la **PORPHYRIE LATENTE**, seuls le porphobilinogène, l'acide δ aminolévulinique et parfois l'uroporphyrine sont éliminés par l'urine à des taux anormaux. Richards et Scott (27) ont proposé un test diagnostique comportant un dosage du porphobilinogène et de l'acide δ aminolévulinique après absorption de glycine, qui peut rendre service dans le dépistage des porteurs de la tare.

En dehors des troubles portant sur le métabolisme des porphyrines, il est possible de détecter dans le plasma des perturbations touchant la bilirubinémie, la sidérémie, l'équilibre hydroélectrolytique (28), l'iodémie (29). On a rapporté aussi des variations dans le contenu lipidique du cerveau (30).

LE MECANISME BIOCHIMIQUE de la Porphyrie aiguë intermittente a été largement étudié. Il n'est pas possible de rendre responsable des symptômes de la maladie l'accumulation hépatique de porphobilinogène et d'acide δ aminolévulinique. Plusieurs hypothèses ont été présentées. L'acide δ aminolévulinique dérivant du succinyl-coenzyme A et de la glycine, on a voulu rapporter le trouble biochimique à une perturbation du métabolisme de la sérine (Richards et Scott). D'autres auteurs (Aldrich en particulier) ont suggéré que le trouble résiderait en fait dans une déficience du métabolisme des purines, on sait en effet, que l'acide δ aminolévulinique est partiellement métabolisé en purines, ce trouble conduirait donc à une exagération du métabolisme des

porphyrines du type III. L'action favorable de l'acide adénosine 5 monophosphorique serait en faveur de cette hypothèse. Pour Rimington (31) le défaut métabolique serait en fait situé au niveau de la synthèse de l'acétylcholine, survenant soit lors de l'acétylation de la choline, soit lors de la répartition inégale de l'acétyl-coenzyme A vis-à-vis des différents cycles auxquels il participe.

VII-4 - PORPHYRIE GENETIQUE SUD-AFRICAINE -

ou Protocoproporphyrine, *Porphyria variegata*, Porphyrie mixte, *Porphyria cutanea tarda hereditaria*.

La Porphyrie Génétique Sud-Africaine est une affection restée longtemps difficile à classer en raison de sa symptomatologie clinique la rapprochant à la fois de la porphyrie aiguë intermittente et de la porphyrie cutanée. Il s'agit en fait d'une porphyrie mixte appelée par Waldenström *Porphyria cutanea tarda hereditaria*. C'est grâce aux travaux de Dean et Barnes (32,33) qui l'ont étudiée particulièrement dans la population blanche sud-africaine où elle est fréquemment rencontrée, que cette maladie a été reconnue comme une entité clinique. Son caractère héréditaire a été tout à fait démontré par ces auteurs grâce à l'étude d'une famille descendant d'émigrés hollandais du XVIIe siècle.

Cette porphyrie se signale par des troubles cutanés siégeant de préférence sur les mains et le visage. La peau est en effet sensible à la lumière et peut présenter des formations bulleuses. Les symptômes cutanés sont en général plus nets chez les hommes que chez les femmes, mais selon le cas, ils peuvent prendre des aspects assez polymorphes et se retrouver pendant toute la vie de l'individu. Quelques fois apparaissent des crises aiguës caractérisées par des douleurs abdominales et des signes neurologiques rappelant tout à fait la crise de porphyrie aiguë. Ces accès surviennent en général entre seize et cinquante ans. Il existe une

forme latente se révélant uniquement par des signes cutanés et abdominaux frustes.

La porphyrie du type sud-africain est transmise comme un caractère mendélien dominant autosomique, la fréquence voisine de 50 pour cent a été retrouvée en effet par Dean et Barnes.

LE SYNDROME BIOCHIMIQUE se manifeste par une excrétion anormalement élevée de coproporphyrines et de protoporphyrines dans les **FECES**, d'où le nom de protocoproporphyrurie. Ce signe extrêmement important existe constamment pendant les phases de rémission clinique, c'est-à-dire pendant la phase cutanée pure chez les porteurs latents de la tare. Chez les enfants présentant uniquement une éruption cutanée c'est l'élément permettant de distinguer la prorocoproporphyrurie de la porphyrie congénitale.

Les taux des **PORPHYRINES URINAIRES** et de leurs précurseurs (porphobilinogène et acide δ aminolévulinique) sont normaux en dehors des périodes aiguës ou subaiguës abdominales ou neurologiques. Mais au cours des crises on constate une forte élimination de porphobilinogène, d'acide δ aminolévulinique, et d'uroporphyrines. **Le FOIE** contient alors des quantités importantes de porphobilinogène et d'acide δ aminolévulinique, tandis que l'uroporphyrine est seule retrouvée au cours des poussées cutanées.

La porphyrie sud-africaine a été rapprochée d'**AUTRES FORMES DE PORPHYRIES** à symptomatologie mixte. C'est par exemple les cas décrits par Holti et ses Collaborateurs (34) dans lesquels il a été possible de constater que l'élimination fécale des copro et protoporphyrines est élevée tant que ne survient pas une crise abdominale ou neurologique. On note en effet que cette crise s'accompagne d'une élimination urinaire accrue de porphyrines et de leurs précurseurs tandis que les taux des copro et protoporphyrines des fèces diminuent. Les porphyries de ce type classées par Holti dans les porphyries cutanées tardives et par d'autres auteurs dans les porphyries mixtes en raison de symptômes cliniques un peu différents, demeurent actuellement des formes mal individualisées.

VII-5 - PORPHYRIES CUTANÉES -

La question de la classification des porphyries à symptomatologie cutanée pure au sein des porphyries hépatiques a été abordée à la Conférence de Capetown et demeure incomplètement résolue. Il est en effet très difficile actuellement de faire la part du facteur génétique dans cette affection qui, au cours de ces quinze dernières années, s'est révélée relativement fréquente.

LA PORPHYRIE CUTANÉE a été décrite en France par Bolgert, Canivet et Le Sourd (35). Nous en avons étudié plusieurs cas (36, 37) dont le comportement clinique et biologique correspond en tous points à cette description. Il s'agit bien là d'une véritable entité clinique dont nous envisagerons ultérieurement les rapports qui peuvent l'unir à d'autres formes de porphyries cutanées.

La porphyrie cutanée dite de l'adulte s'observe chez les sujets de 40 à 70 ans avec prédominance masculine. Les symptômes cutanés sont caractérisés par la présence de bulles, de macules atrophiques, de microkystes et d'une pigmentation particulière. Les bulles apparaissent par poussées sur les parties découvertes du corps, leur aspect histologique est tout à fait caractéristique. Les macules atrophiques traduisent une fragilité spéciale de la peau. Ce sont des lésions succédant aux bulles ou à des excoriations cutanées banales. Les microkystes occupent les parties découvertes et subissent une éviction spontanée. La pigmentation est constante, limitée à la région temporo-malaire.

L'examen clinique du malade peut révéler aussi une hépatomégalie dont l'origine éthylique est fréquente, et parfois aussi un diabète. Il n'y a jamais de signes abdominaux ou neurologiques.

Au moment de l'éruption bulleuse les malades ont l'attention attirée par la coloration rouge plus ou moins intense de leurs urines. La **PORPHYRINURIE** peut en effet être très importante; il n'est pas rare de trouver des éliminations de l'ordre de plusieurs dizaines de milligrammes d'uroporphyrine par 24 heures.

L'uroporphyrine peut être éliminée à l'état de complexe cuivrique ainsi que l'a montré Canivet. L'élimination d'uroporphyrine porte sur les isomères I et III en proportions variables mais avec prédominance de l'isomère I. La coproporphyrinurie est modérément élevée. Les taux de porphobilinogène et d'acide aminolévulinique sont normaux. A côté de ces signes urinaires, il convient de noter que l'hypersidérémie est assez constante et peut atteindre 300 microgrammes pour 100 ml.

L'aspect clinique du malade et l'examen chimique des urines conduisent en général à un diagnostic sans ambiguïté. Cependant lorsque l'on veut être certain de la photodépendance de l'éruption bulleuse, l'utilisation de radiations U.V. aux environs de 410 m μ rend les plus grands services.

LA THERAPEUTIQUE de la porphyrie cutanée de l'adulte est tout à fait précaire. Il convient évidemment de traiter le terrain hépatique ou autre du malade mais, en ce qui concerne strictement le syndrome cutané les résultats parfois favorables obtenus avec les antipaludiques de synthèse (Nivaquine en particulier), avec l'acide adénosine 5-monophosphorique ou les vitamines du groupe B, sont trop inconstants dans cette affection dont l'étiologie demeure très obscure.

Il existe certainement une confusion dans la terminologie concernant la porphyrie cutanée. Elle a en effet été confondue avec la *Porphyria cutanea tarda* décrite par Waldenström ou considérée comme une porphyrie congénitale à révélation tardive. De plus, de nombreux cas de porphyries cutanées présentant aussi des signes abdominaux ou neurologiques, ont contribué à laisser planer un doute sur l'individualité de la porphyrie cutanée. Nous avons précédemment vu que la classification des porphyries hépatiques s'est considérablement éclaircie. Les descriptions cliniques et biologiques exactes de la protocoproporphyrine différencient nettement cette dernière de la porphyrie purement cutanée, et l'on a voulu les opposer par leur dénomination respective de *porphyria cutanea tarda hereditaria* et de *porphyria cutanea tarda symptomatologica* (38).

Les nombreux cas qui ont été publiés tout au moins en France, montrent qu'il n'est pas possible d'assigner avec certitude à cette maladie un caractère héréditaire. Il semble donc que le caractère acquis soit plus probable et c'est ce qu'il est possible de confirmer par un éthylisme intense rencontré beaucoup plus fréquemment dans la porphyrie cutanée des Bantous que dans celle de nos pays.

L'éventualité d'une forme toxique de porphyrie a été mise en évidence par Schmid (39) à la suite de l'épidémie de porphyrie cutanée survenue en 1956 en Turquie chez plusieurs centaines d'individus s'étant nourris de blé conservé avec de l'hexachlorobenzène. Cet auteur a pu recréer chez l'animal par administration de ce composé, une véritable porphyrie expérimentale.

Enfin, il convient de signaler l'association assez troublante d'une porphyrie cutanée à des syndromes hématologiques ou tumoraux malins.

- V I I I -

L E S P O R P H Y R I N U R I E S

S E C O N D A I R E S

On appelle quelquefois ces porphyrinuries "porphyries secondaires ou symptomatiques". Elles se rencontrent dans des affections diverses et sont caractérisées par l'absence d'uroporphyrines en quantité anormale dans les humeurs. Le signe essentiel est une coproporphyrinurie portant sur les isomères I ou III ou les deux, pouvant atteindre des taux de plusieurs milligrammes par 24 heures, sa disparition coïncidant avec la guérison de la maladie causale.

La connaissance de ces porphyrinuries secondaires est importante. On sait en effet, que la protoporphyririe érythropoiétique par exemple se caractérise par l'absence de perturbations dans le métabolisme des uroporphyrines et aussi que le saturnisme s'accompagne d'une coproporphyrinurie parfois très abondante avec des taux plus ou moins élevés de protoporphyrine libre des globules rouges, de porphyrines fécales et de porphobilinogène et acide δ aminolévulinique urinaires et sanguins.

Lorsque l'étiologie de ces porphyrinuries est inconnue il conviendra donc de ne pas limiter les examens de laboratoire au seul dosage des coproporphyrines urinaires mais de les étendre aux autres milieux biologiques, aux autres porphyrines et aux précurseurs.

Nous envisagerons rapidement quelques affections s'accompagnant de porphyrinurie.

- INTOXICATIONS -

SATURNISME

La porphyrinurie est un des signes les plus précoces et les plus constants. Elle porte sur la coproporphyrine III dont il n'est pas rare de trouver des quantités de l'ordre de 3 milligrammes par 24 heures. Les fécès contiennent des taux souvent élevés de coproporphyrine I. Il a été démontré que le dosage de la protoporphyrine libre des globules rouges, de l'acide aminolévulinique et du porphobilinogène dans le plasma et l'urine sont d'un grand intérêt diagnostique et pronostique (40). On estime que le trouble siège dans la moelle osseuse au niveau de la protoporphyrinogénèse.

SULFAMIDES

Une hyperporphyrinurie peut survenir au cours d'un traitement par les sulfamides. Selon Rimington (41) il existe un parallélisme entre l'intensité de la méthémoglobinémie et celle de la porphyrinurie. La condition nécessaire pour qu'apparaisse le trouble urinaire est que le sulfamide soit méthémoglobinisant, donnant au cours de son métabolisme des intermédiaires du type de la para-iminoquinone.

ALCOOL

L'alcool élève la porphyrinurie. Dans certains grands alcoolismes elle peut atteindre 2 milligrammes par 24 heures.

DES TOXIQUES DIVERS

Sulfonal, Trional, Barbituriques, Pyramidon sont considérés comme causes déclanchantes de la crise de porphyrie aiguë. Il convient de les proscrire de la thérapeutique des porphyries. On note aussi une élévation de la porphyrinurie au cours des traitements par les arsenicaux (Salvarsan).

- MALADIES HEPATIQUES -

CIRRHOSES

Hyperporphyrinurie de plusieurs centaines de microgrammes portant sur les coproporphyrines I et III ou l'un des deux isomères. Certains auteurs considèrent cette élévation comme un bon test de fonctionnement hépatique. On peut aussi trouver des coproporphyrines dans le plasma et dans le liquide d'ascite. Il y a de plus augmentation de la protoporphyrine libre des globules rouges.

ICTERE CATARRHAL, CANCER DU FOIE

ICTERE HEMOLYTIQUE

La porphyrinurie est inconstante, parfois normale, parfois s'élevant à 2000 microgrammes par 24 heures. Les porphyrines fécales et la protoporphyrine libre des globules rouges peuvent être aussi augmentées.

- AFFECTIONS HEMATOLOGIQUES -

ANEMIES SECONDAIRES

ANEMIES PERNICIEUSES

LEUCEMIE, MALADIE DE HODGKIN.

- MALADIES CUTANÉES -

Les porphyries cutanées étant à part, la fréquence de l'hyperporphyrinurie est plus ou moins grande. La photosensibilisation est reconnue sans que l'on puisse en tirer de déduction étiologique ou pathognomonique. Ce sont : l'Hydroavacciniforme ou estival de Bazin, le Xeroderma pigmentosus, l'Epidermolyse bulleuse, l'Eczéma, la Dermatitis des prés, la Mélanose de Riehl, le Pemphigus, l'Urticatoire solaire, le Pityriasis rosé.

AVITAMINOSES

Porphyrinuries fréquentes pouvant atteindre plusieurs centaines de microgrammes : Pellagre, Sprue, Carence en acide pantothénique.

AFFECTIONS DIVERSES

Maladies infectieuses aiguës, états fébriles
en général.

- I X -

RECHERCHE, DOSAGE,
SEPARATION ET IDENTIFICATION
DES PORPHYRINES ET DE
LEURS PRECURSEURS DANS LES
MILIEUX BIOLOGIQUES

La recherche et le dosage des porphyrines et de leurs précurseurs représentent l'étape initiale importante du dépistage biochimique d'un trouble de leur métabolisme. Il s'agit en fait d'examen d'orientation portant d'abord sur l'urine et s'étendant éventuellement aux autres milieux biologiques. Il est par conséquent indispensable d'avoir recours à des techniques d'extraction par solvants suffisamment précises, sensibles et sélectives, pour le dosage en particulier lorsque l'on opère par spectrométrie de la bande de Soret encore plus sensible à la présence de parasites que la fluorométrie. En règle générale, les solutions extractives des prélèvements biologiques contiennent des impuretés qui absorbent d'une manière plus ou moins linéaire dans le visible. Pour corriger l'absorption due à ces impuretés, une lecture à trois longueurs d'ondes est pratiquée, la densité optique corrigée étant donnée par l'expression :

$$\text{D.O. corrigée} = \frac{2 \text{ D.O. Max.} - (\text{D.O. 430} + \text{D.O. 380})}{k}$$

k est un facteur déterminé expérimentalement sur des porphyrines pures. Ce sont les travaux de Rimington(4), Rimington et Sveinson (5) et With (6) qui ont introduit ce mode d'expression des résultats. Il est généralement utilisé. D'autres auteurs lui ont apporté quelques modifications.

La séparation et l'identification des porphyrines et de leurs isomères apportent l'élément de certitude au diagnostic du défaut métabolique. On procède le plus souvent à l'application de techniques chromatographiques.

Le choix des méthodes que nous citons est forcément arbitraire. Il a été guidé par leur facilité d'application au laboratoire et les résultats satisfaisants qu'elles fournissent quelles que soient les porphyrines en cause et leurs proportions relatives dans les divers prélèvements biologiques : urines, fèces, sang...

IX.1 - RECHERCHE ET DOSAGE DES PORPHYRINES ET DE LEURS PRECURSEURS DANS L'URINE -

- RECHERCHES PRELIMINAIRES -

Ces recherches préliminaires présentent un intérêt lorsque l'on a en vue le diagnostic d'une porphyrie. Trois caractères sont importants :

- Coloration de l'urine.

L'urine peut être de coloration normale, ambrée ou rouge Porto selon la quantité de porphyrines et le type de porphyrie.

- Fluorescence de l'urine en lumière de Wood.

Cette fluorescence rouge orangée extrêmement sensible même à de très grandes dilutions en solutions pures, n'est visible directement dans l'urine que dans les cas d'élimination abondante. Lorsqu'elle est positive, la fluorescence est un signe de grande valeur pour un diagnostic rapide, toutefois son absence n'exclut pas l'existence d'une porphyrie en décours de crise par exemple où l'élimination peut être très faible. De plus, des pigments urinaires parasites peuvent l'inhiber plus ou moins complètement.

- Recherche du spectre des porphyrines.

La recherche rapide du spectre des porphyrines peut être pratiquée simplement avec un spectroscope de poche ou mieux avec un spectrophotomètre. Le spectre caractéristique à 4 bandes des porphyrines libres est vu directement dans la porphyrie congénitale. Par contre dans les porphyries hépatiques, l'élimination porte fréquemment sur des complexes métalloporphyriniques (zinciques en particulier) dont le spectre présente 2 bandes voisines de 540 et 580 m μ . Ces 2 bandes extrêmement proches de celles de l'hémoglobine et de la myoglobine en sont distinguées par acidification avec l'acide chlorhydrique qui fait apparaître le spectre des porphyrines libres.

- Les recherches précédentes peuvent être négatives pour 2 raisons :

- On est en présence d'une porphyrinurie peu abondante. Il faut alors concentrer les porphyrines. Quelques ml d'urine sont acidifiés à pH 3-4 avec HCl et agités avec un peu de talc ou un ml environ d'alcool amylique. Après centrifugation, le talc ou l'alcool ont une fluorescence intense aux U.V. D'autres procédés de concentration seront envisagés ultérieurement.

- On est en présence d'une urine fraîche de porphyrie aiguë (coloration normale). L'urine acidifiée avec HCl à pH 3-4 et chauffée au bain-marie bouillant, ou ayant séjourné à la lumière, prend alors une coloration plus ou moins rouge et la fluorescence apparaît. L'urine contenait du porphobilinogène qu'il convient de rechercher.

- DOSAGE DES COPROPORPHYRINES -

La plupart des méthodes de recherche des coproporphyrines reposent sur leur solubilité dans l'éther en présence d'acide acétique et dérivent de la méthode initiale de H. Fischer (42, 43, 44, 45, 46, 47). Les coproporphyrines sont réextraites de l'éther par l'acide

chlorhydrique dilué et le dosage est effectué par spectrométrie ou fluorométrie.

Différentes techniques proposent le dosage des porphyrines totales (coproporphyrinogènes + coproporphyrines) après oxydation (48, 49).

En fait plusieurs techniques permettent le dosage d'autres porphyrines. Nous utilisons habituellement la technique de Dresel, Rimington et Tooth (50) que nous développerons ultérieurement.

D'autres méthodes utilisent une adsorption sur alumine (51), phosphate (52) ou Florisil (53, 54).

- DOSAGE DES UROPORPHYRINES -

Le dosage des uroporphyrines urinaires en raison de l'importance pathognomonique qui s'y attache doit être envisagé sous plusieurs aspects :

- On peut être en présence d'une porphyrie aiguë qui se caractérise par une élimination importante des précurseurs, et faible d'uroporphyrines préformées. Il y a intérêt dans ce cas à effectuer deux dosages, l'un sur l'urine non traitée, l'autre sur l'urine acidifiée à pH 3-4 et chauffée pendant 15 minutes environ au bain-marie bouillant à l'obscurité. Dans ces conditions le porphobilinogène est transformé en uroporphyrine III et en d'autres pigments de nature mal connue.

- On peut avoir à rechercher de faibles quantités d'uroporphyrines, soit celles existant physiologiquement, soit celles rencontrées durant les périodes de rémission ou de latence d'une porphyrie.

- On peut être enfin en présence de quantités très grandes de porphyrines de l'ordre de plusieurs milligrammes ou dizaines de milligrammes (porphyrie congénitale, porphyrie cutanée), le dosage direct de l'uroporphyrine sur une dilution d'urine convenable est alors tout à fait satisfaisant.

Il est par conséquent nécessaire suivant les circonstances d'opter pour l'une ou l'autre des techniques ayant recours à une concentration par adsorption ou une extraction par des solvants ou enfin, au dosage direct. Il faut néanmoins que ces techniques demeurent toujours quantitatives.

- Méthodes de dosage par extraction par solvants.

Dans les méthodes utilisant l'extraction de l'uroporphyrine par un solvant, on doit faire la part de la présence des deux isomères I et III pour lesquels le rendement doit être quantitatif. De plus les coproporphyrines sont solubles dans les mêmes solvants à l'exception de l'éther. Il est donc nécessaire pour extraire quantitativement les uroporphyrines d'éliminer auparavant les coproporphyrines par l'éther.

Les meilleurs solvants des uroporphyrines sont l'acétate d'éthyle et la cyclohexanone. L'acétate d'éthyle avait été proposé par Waldenström (19) pour le dosage de l'uroporphyrine III dans la porphyrurie aiguë en s'appuyant sur le fait que à pH 3,0-3,5 l'isomère I n'était pas extrait. Cette notion a été infirmée par Dresel, Rimington et Tooth (50) qui ont montré que quelle que soit la concentration en isomères I ou III il ne semble pas y avoir de différence de solubilité dans l'acétate d'éthyle. Ces auteurs ont montré d'autre part que l'uroporphyrine I et III est extraite par la cyclohexanone à pH 1,5 (50). C'est cette technique que nous utilisons habituellement. Elle donne un rendement de 100 % pour des taux d'uroporphyrines de l'ordre de 1 mg par litre, de 80 % pour des taux de 100 microgrammes par litre et de 68 % pour des taux inférieurs à 20 microgrammes par litre.

- Méthodes de dosage par adsorption.

Lorsqu'il est nécessaire d'obtenir une concentration des uroporphyrines à partir de l'urine, divers adsorbants ont été proposés, en particulier : kieselguhr (55), talc (24,56), phosphate de calcium (57, 58, 59), cellulose (60), florasil (53), alumine (61).

L'adsorption porte sur l'urine totale ou débarrassée des coproporphyrines. Les porphyrines adsorbées sont éluées en milieu acide ou alcalin ou avec des solvants organiques. Très souvent l'adsorption sur le talc constitue une étape préparatoire à l'estérification plus qu'une phase du dosage.

- Dosage direct des uroporphyrines.

Dans les cas où l'urine contient de grandes quantités d'uroporphyrines, il est possible d'effectuer un dosage direct sur l'urine diluée avec HCl 1,5 N par spectrométrie ou fluorométrie.

- RECHERCHE ET DOSAGE DU PORPHOBILINOGENE -

- Recherche.

La recherche du porphobilinogène (PBG) dans l'urine est pratiquée aisément sur une urine fraîchement émise avec le réactif d'Ehrlich ou paradiméthylaminobenzaldéhyde, proposé par Watson et Schwartz (62) qui donne une coloration rouge.

La nature du pigment formé et les conditions de la recherche ont été étudiées par Waldenström (19) et Prunty (63). La paradiméthylaminobenzaldéhyde est un réactif non spécifique susceptible de donner des erreurs par excès avec d'autres chromogènes urinaires, l'urobilinogène en particulier. Cependant, la coloration rouge donnée par le PBG présente deux bandes, une principale à 555 m μ , une secondaire à 525 m μ , alors que l'urobilinogène donne un spectre à une seule bande. Ce comportement différent est insuffisant pour une caractérisation certaine, deux modifications ont été proposées :

- soit en ajoutant un égal volume d'une solution saturée d'acétate de sodium et un peu de chloroforme : la coloration rouge due au PBG demeure dans la phase aqueuse (Watson et Schwartz, 62). L'alcool benzylique, l'alcool amylique et le n-butanol sont de meilleurs solvants.

- soit en saturant l'urine avec du sulfate d'ammonium, l'urobilinogène est retenu par le précipité et le PBG est caractérisé dans le filtrat avec le réactif d'Ehrlich (Formijne, 64).

Certains composés urinaires sont susceptibles d'inhiber cette réaction : cystéine, thiourée, dérivés indoliques (65; 66). C'est pourquoi le PBG ne peut être décelé et dosé dans l'urine, surtout dans les conditions d'élimination normale, qu'après purification par passage sur résine.

- Dosage.

Le dosage peut être effectué directement sur l'urine diluée dans les cas d'élimination importante selon la technique de Walquist (67) par addition d'un égal volume de réactif d'Ehrlich. L'absorption est mesurée à 555 m μ :

$$E \frac{1\%}{1\text{ cm}} = 1,136$$

Les méthodes fournissant les résultats les meilleurs utilisent un passage sur résine Dowex 2 et élution par l'acétate d'ammonium 0,5 M (Rimington-Krol, Tooth, 66) ou l'acide acétique N et 0,2 N (Mauzerall et Granick, 68), avant de pratiquer la réaction colorée. La lecture peut être faite à 2 longueurs d'ondes pour corriger l'absorption due aux parasites (69).

- RECHERCHE ET DOSAGE DE L'ACIDE γ AMINOLEVULINIQUE -

- Recherche.

La recherche de ALA peut être pratiquée selon deux grands procédés, soit par précipité sous forme de picrate en milieu alcalin (Shuster, 70; Elliott, 71), soit par transformation en dérivé pyrrolique à chaud avec l'acétylacétone puis condensation avec le réactif d'Ehrlich (Shuster, 70; Mauzerall et Granick, 68). Ce second type de réaction est beaucoup plus satisfai-

sant. Il convient de séparer l'acide δ aminolévulinique et le porphobilinogène soit par fixation sur résine Dowex 2 et Dowex 50x8 (Granick et Van den Schrick, 72; Mauzerall et Granick, 68; Shawkia Mehani, 73), soit par chromatographie sur papier (Berlin, Neuberger et Scott, 74; Elliott, 71) ou électrophorèse (Gibson, Laver et Neuberger, 75; Haeger-Aronssen, 40).

- Dosage.

Le dosage est pratiqué sur l'urine (Mauzerall et Granick, 68). La même technique est applicable au sérum déprotéinisé par l'acide trichloracétique (Gibson, 75).

Les méthodes de détermination de ALA dosent les aminocétone en général. L'aminocétone existe normalement dans l'urine. Plusieurs méthodes chromatographiques (Urata et Granick, 76; Schlenker, Taylor et Kiehn, 77) permettent de doser séparément ALA, PBG et aminocétone.

IX.2 - DOSAGE DES PORPHYRINES DANS LES FECES -

L'analyse des selles en vue du dosage des uro-, copro- et protoporphyrines, est rendue difficile en raison de la présence en quantités plus ou moins importantes de dérivés de la chlorophylle, des pigments biliaires, de porphyrines diverses et des produits résultant de l'action des bactéries.

Une des méthodes d'extraction les plus satisfaisantes est celle de Schwartz et Collaborateurs (78) qui permet la séparation de uro-, copro- et protoporphyrines. La séparation des porphyrines éthérosolubles peut être réalisée par contre-courant (79, 80).

On peut aussi procéder à une estérification directe des selles par le méthanol chlorhydrique ou le méthanol sulfurique, extraire les esters méthyliques par le chloroforme et les chromatographier. La séparation

des esters sur alumine par exemple puis leur chromatographie sur papier après hydrolyse permettent une identification précise.

L'analyse des porphyrines fécales est des plus importantes pour la classification d'une porphyrie (81).

IX.3 - DOSAGE DES PORPHYRINES DANS LES GLOBULES ROUGES

ET LE PLASMA

La méthode initiale de Vanden Berg et Grotepass (82) pour le dosage de la protoporphyrine libre des hématies a été reprise et modifiée par différents auteurs (83, 84, 85). L'extraction est pratiquée avec l'acétate d'éthyle qui dissout en fait proto- et coproporphyrines. En raison du grand intérêt que présente le taux de coproporphyrines des globules rouges dans certaines porphyries, il convient donc de pratiquer un fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle avec des acides chlorhydriques dilués pour doser séparément et d'une manière suffisamment spécifique, la protoporphyrine libre et les coproporphyrines des globules rouges (85). La technique de Wranne conduit aux meilleurs résultats (86).

Lorsque l'on désire doser les uroporphyrines dans les globules rouges, on les extrait de la purée globulaire résiduelle et des solutions d'acétate de sodium de lavages (78, 86).

Les mêmes méthodes sont applicables aux porphyrines plasmatiques.

Les taux faibles de ces porphyrines à l'état normal, la complexité des milieux biologiques de départ, font que la fluorométrie est fréquemment utilisée de préférence à la spectrométrie.

L'ALA est dosé dans le sérum par la technique de Gibson (75), le PBG par la technique de Dresel et Falk (86 bis).

IX.4 - RECHERCHE DES PORPHYRINES DANS LES AUTRES

PRELEVEMENTS BIOLOGIQUES -

Lorsque l'on s'adresse à d'autres prélèvements biologiques (foie, os, bile, peau, etc...) la recherche des porphyrines peut être faite par des techniques analogues (Schwartz, 78).

IX.5 - SEPARATION ET IDENTIFICATION DES PORPHYRINES DES

MILIEUX BIOLOGIQUES -

La séparation des porphyrines libres ou de leurs esters par chromatographie sur colonne est en fait une étape préparative surtout lorsqu'elle s'adresse à des milieux complexes comme les urines ou les fécès. En effet, la séparation sur colonne n'est pas toujours parfaite par suite des variations rencontrées dans le comportement physicochimique des supports, la pureté plus ou moins grande des solvants utilisés, l'imprécision laissée par certains auteurs dans leurs procédés. Aussi est-il souvent indispensable d'opérer des fractionnements répétés, les fractions étant identifiées ultérieurement, en général par chromatographie sur papier. Cependant, la chromatographie sur colonne demeure dans le cas des esters tout particulièrement, le seul moyen d'obtenir un matériel de travail abondant et suffisamment pur. Lorsque l'on s'adresse à de faibles quantités, l'électrophorèse et la distribution par contre-courant sont aussi utilisées.

Nous ne retiendrons que les procédés de séparation et d'identification permettant de résoudre la plupart des problèmes que posent les porphyrines en biologie humaine, en envisageant successivement les porphyrines libres et les porphyrines estérifiées.

IX.5.1 - PORPHYRINES LIBRES -

- Chromatographie sur colonne.

En ce qui concerne les porphyrines libres, la chromatographie sur colonne est peu utilisée. Le kieselguhr (55), le talc (87), la cellulose (88), le florasil (89), ont été appliqués à l'analyse des urines. La séparation des porphyrines est convenable, les isomères ne sont pas différenciés.

Récemment, une chromatographie sur alumine d'urine débarrassée des coproporphyrines a été proposée qui conduirait à la séparation des isomères I et III de l'uroporphyrine (90).

- Chromatographie sur papier.

Il s'agit d'une des méthodes les plus employées. Elle permet la séparation de très petites quantités de porphyrines et leur identification en présence d'étalons. La fluorescence très intense des porphyrines (et de leurs esters) peut être encore augmentée en pulvérisant le papier avec de l'isooctane ou du kérosène.

La séparation des porphyrines sur papier a été réalisée pour la première fois par Nicholas et Rimington (91, 92) en utilisant comme solvant un mélange de 2,4-2,5 lutidine (diméthylpyridine). De nombreuses variantes ont été proposées par l'emploi de 2,6 lutidine (Kehl et Stieh, 93; Erickson, 94) ou de 2,4-2,6 lutidine (Corwin et Orten, 95), principalement.

Le principe est simple : il consiste à déposer sur le papier (Whatman N° 1 ou Schleicher et Schull 2043 b) les porphyrines libres en général en

solution ammoniacale (0,1 à 5 microgrammes) (éluat de talc, par exemple). Les solvants sont des lutidines mélangées avec des quantités d'eau variables. On opère ou non en atmosphère ammoniacale, mais toujours à l'obscurité. La chromatographie est ascendante ou descendante. Dans ces conditions, les R_F des porphyrines sont dans l'ordre inverse du nombre des groupements carboxyliques. Les valeurs de R_F les plus fréquemment rencontrées sont les suivantes :

uroporphyrines	0,08-0,10
coproporphyrines	0,40-0,50
protoporphyrines et)	0,70-0,80
p.dicarboxyliques)	
esters	1

L'uroporphyrine donne souvent 2 petits spots, phénomène sur lequel nous reviendrons. La chromatographie sur papier dans la lutidine ne sépare pas les isomères des porphyrines sauf dans des conditions spéciales pour les coproporphyrines. Une forte concentration en sels ou la présence de lipides dans un extrait biologique gênent la migration.

La chromatographie sur papier a rendu les plus grands services dans la connaissance de nouvelles porphyrines à 1, 3, 5, 6, 7 groupements carboxyliques rencontrées dans les urines de certaines porphyries, dont la structure a été pressentie par leur position sur les chromatogrammes (Nicholas et Rimington).

With (96) a proposé l'emploi d'une solution aqueuse de chlorure de lithium en atmosphère d'ammoniacale. Les porphyrines se répartissent sur le papier dans un ordre inverse des chromatographies dans la lutidine.

- Electrophorèse.

L'électrophorèse fournit une bonne séparation des porphyrines polycarboxyliques sans différencier les isomères. Dans le domaine biologique, les supports utilisés sont la gélose (97, 98) mais surtout le papier avec tampon alcalin (99, 100, 101, 102). Ippen (103) effectue des électrophorégrammes de porphyrines urinaires à l'état de chélates Fe^{2+} .

- Distribution par contre-courant.

La distribution par contre-courant possède l'avantage sur les méthodes précédentes de permettre la séparation des porphyrines dicarboxyliques par l'emploi de nombres chlorhydriques très peu différents. Il n'y a pas non plus de séparation des isomères des autres porphyrines. Appliquée primitivement par Granick et Bogorad (3) elle donne actuellement de bons résultats dans la séparation des porphyrines fécales éthérosolubles (79, 80).

IX.5.2 - PORPHYRINES ESTERIFIÉES -

- Estérification.

Ce sont les esters méthyliques que l'on utilise le plus communément pour la caractérisation des porphyrines. L'estérification peut être conduite :

- soit par le méthanol saturé d'acide chlorhydrique gazeux (12) ou le méthanol contenant 5 p 100 (p/v) d'acide sulfurique (104, 105). L'extrait bien sec de porphyrines est laissé une nuit en présence du réactif estérifiant à la température du laboratoire et à l'obscurité. On peut opérer aussi sur du talc desséché ayant adsorbé les porphyrines urinaires par exemple ou directement sur les selles. Dans tous les cas, on doit éviter la présence d'eau et employer du méthanol absolu. Les esters sont extraits ensuite rapidement par l'acétate d'éthyle ou mieux le chloroforme, afin d'éviter une saponification. L'extrait chloroformique est lavé jusqu'à neutralité et évaporé à sec. Ce procédé d'estérification produit parfois une hydroxylation des chaînes latérales vinyles en groupements α hydroxyéthyles. C'est pourquoi il vaut mieux employer le procédé au diazométhane pour la protoporphyrine.

- soit par le diazométhane (106) pendant 5 minutes.

Le contrôle d'une bonne estérification se fait par chromatographie sur papier dans le chloro-

forme; les porphyrines non estérifiées restent sur la ligne de départ.

- Chromatographie sur colonne.

La chromatographie sur colonne des esters méthyliques est certainement la méthode de choix pour obtenir une bonne séparation des porphyrines, et des produits purs cristallisés. Elle ne sépare pas les isomères des porphyrines.

Elle a tout particulièrement été étudiée par Nicholas (107) qui a montré que trois adsorbants, lorsque leur activité est bien définie selon Brockmann, conduisent aux meilleurs résultats. Ce sont l'alumine, l'oxyde et le carbonate de magnésium et le carbonate de calcium. Les solvants sont le benzène, le chloroforme, le méthanol et l'éther de pétrole qui doivent tous être soigneusement purifiés. De nombreuses variantes ont été apportées à cette méthode initiale (108, 109). Sur colonne d'alumine les esters méthyliques sont élués dans l'ordre du nombre de groupements carboxyliques croissant. Au contraire sur oxyde ou carbonate de magnésium, ce sont les uroporphyrines qui sont éluées en premier.

La chromatographie des porphyrines urinaires estérifiées a été codifiée par Weatherall (110) et Comfort, Moore et Weatherall (111). Les fécès fournissent des chromatogrammes très complexes. Lorsque l'on désire séparer les porphyrines dicarboxyliques (proto- et mésoporphyrines) des techniques spéciales doivent être mises en oeuvre (112).

Pour obtenir des fractions pures il est parfois utile d'effectuer plusieurs chromatographies sur adsorbants d'activités différentes avec des solvants différents. L'élution des zones des chromatogrammes est faite avec du chloroforme contenant un peu de méthanol. Le solvant est ensuite évaporé sous vide.

- Cristallisation des esters méthyliques.

Les esters méthyliques ont la propriété de bien cristalliser même à partir de solutions relativement impures. Le meilleur procédé de cristallisation

totale des mélanges d'isomères consiste à les dissoudre complètement dans le chloroforme pur et sec en quantité juste suffisante. Cette solution est portée au bain-marie bouillant. On ajoute un égal volume de méthanol absolu. Le chloroforme distille et les cristaux se forment à froid. On doit cependant ne pas évaporer tout le chloroforme sinon les esters précipitent à l'état amorphe. On recueille les cristaux et on les lave au besoin avec un peu de méthanol absolu froid.

Les cristaux d'esters méthyliques ont une coloration rouge sombre, ils ne sont pas fluorescents. Leurs formes cristallines souvent en touffes de cheveux sont assez différentes selon les isomères, mais elles ne peuvent servir à leur identification. On sait en effet, que les esters méthyliques des uro- et coproporphyrines sont très polymorphes et forment des cristaux mixtes d'isomères. La distinction des isomères I et III des porphyrines retirées des milieux biologiques est du plus grand intérêt dans les porphyrines.

- Les points de fusion des esters méthyliques sont déterminés au banc chauffant de Köffler ou au bloc Maquenne. Les points de fusion doubles ne sont pas rares. Ils sont dus à la formation de cristaux de points de fusion plus élevés lors de la première fusion ou après refroidissement. La connaissance d'un point de fusion bien défini est insuffisante pour évaluer la teneur respective des isomères I et III dans les cristaux mixtes d'uro- ou de coproporphyrines, ainsi que l'ont montré Jope et O'Brien (113) et Nicholas et Rimington (114). Nous reviendrons dans la deuxième partie sur cette très importante question.

- Hydrolyse des esters méthyliques.

L'hydrolyse des esters est pratiquée en général en les dissolvant dans HCl 6,85 N ou 7 N. A l'obscurité et à la température du laboratoire un temps de 48 heures est suffisant pour les porphyrines octacarboxyliques. Pour les porphyrines dicarboxyliques, un temps plus court est suffisant (environ 5 heures), la protoporphyrine subit toujours une hydroxylation partielle des groupes vinyliques. L'acide chlorhydrique est ensuite éliminé dans le vide en présence de pastilles de

KOH ou NaOH. L'évaporation sous courant d'air ou d'azote produit une décarboxylation et une destruction plus ou moins importante des porphyrines. Les porphyrines libres sont ensuite dissoutes dans un solvant organique approprié ou dans NH_4OH 2 N, pour l'identification par chromatographie sur papier dans la lutidine.

- Décarboxylation des porphyrines.

Le meilleur procédé de décarboxylation des porphyrines est celui de Edmondson et Schwartz(115) par chauffage sous pression réduite en milieu chlorhydrique. La décarboxylation permet, lorsque l'on est en possession d'une très petite quantité de porphyrines pures, de les identifier, par exemple par transformation d'uroporphyrine I en coproporphyrine I.

IX.5.3 - IDENTIFICATION DES ISOMERES DES COPROPORPHYRINES ET DES UROPORPHYRINES -

La séparation, l'identification et la détermination du pourcentage des isomères des copro- et uroporphyrines présentent un intérêt considérable dans les études du trouble du métabolisme des porphyrines in vivo et in vitro. Ces problèmes ont été abordés depuis très longtemps et résolus d'une manière plus ou moins satisfaisante selon que l'on s'adresse à des porphyrines pures ou à des extraits biologiques d'une pureté relative. Nous n'envisagerons que les principales méthodes qui ont été proposées.

- Les différences de solubilités des esters des coproporphyrines I et III ont été mises à profit vis-à-vis du méthanol absolu et froid, qui dissout l'isomère III (Dobriner, 116), soit vis-à-vis de l'éther anhydre qui dissout aussi l'isomère III (Rimington, 117). Ces techniques sont applicables aux esters cristallisés en assez grandes quantités.

- Inhibition de la fluorescence.

Schwartz et Coll. (78) ont utilisé une méthode extrêmement sensible applicable à une petite quantité d'esters de coproporphyrine I et III. Ils opèrent par coprécipitation des isomères dans l'acétone à 33 p 100 à pH 6 dans la glace. L'inhibition de la fluorescence est proportionnelle à la concentration respective des isomères dans le mélange. Un étalonnage est établi avec des mélanges de composition connue.

- Les variations de l'intensité de la fluorescence en fonction du pH des solutions de différents isomères d'uro- et de coproporphyrines avaient été étudiées par Finck et Hoerburger (118) qui avaient montré que la fluorescence d'un isomère est maximum à un pH déterminé. Ces travaux ont été repris par Jope et O'Brien (113) pour les coproporphyrines et par Rimington (119) pour les uroporphyrines. Les spectres de fluorescence en fonction du pH sont identiques pour les isomères I et III. D'ailleurs, s'il en était autrement, l'application aux milieux biologiques serait rendue très difficile du fait des effets gênants de la concentration ionique, de la température, des impuretés, etc... sur les spectres de fluorescence.

- La chromatographie sur alumine des esters des coproporphyrines de Watson et Schwartz (120) avec élution par l'acétone à 35 p 100 pour l'isomère III est un procédé intéressant en solution pure, mais abandonné par les auteurs eux-mêmes pour les milieux biologiques. Panconesi et Sertoli (90) obtiendraient par chromatographie sur alumine une séparation des uroporphyrines libres I et III.

- Séparation des isomères des coproporphyrines libres avec la lutidine.

Falk (121, 122) avait signalé que les mélanges de 2,4-2,5 lutidine et la 2,6 lutidine sont susceptibles de séparer sur papier les isomères I, II et III des coproporphyrines, l'isomère IV migrant avec l'isomère III. Du fait que seuls les isomères I et III intéressent les milieux biologiques, Ericksen (123) avec

un mélange de 2,6 lutidine (5 parties) et d'eau (2 parties) en atmosphère d'ammoniaque sur papier Watman N° 1 a obtenu cette séparation, reprise par Sweeney et Eales (124) sur le plan quantitatif avec élution chlorhydrique (1,5 N) et fluorimétrie. Jensen (125) a appliqué la séparation des coproporphyrines I et III à la chromatographie sur couche mince de gel de silice avec un mélange de 2,6 lutidine (20 ml) et d'eau (6 ml). La technique est quantitative après élution des spots par l'acide chlorhydrique 2 N.

- Séparation des isomères des porphyrines estérifiées.

La séparation des isomères des copro- et uroporphyrines est bien meilleure lorsque l'on utilise leurs esters méthyliques en chromatographie sur papier.

Chu et ses collaborateurs (126, 127) ont décrit une méthode de séparation des isomères I et III des coproporphyrines et de l'uroporphyrine I par chromatographie sur papier Whatman N° 1 en utilisant successivement deux solvants dans la même direction : kérosène - chloroforme (atmosphère chloroforme) puis kérosène - propanol (atmosphère kérosène). Falk et Benson (128) ont étendu cette technique à la séparation des uroporphyrines I et III en introduisant une chromatographie supplémentaire dans une deuxième dimension avec un mélange kérosène - dioxanne (atmosphère dioxanne). On obtient ainsi un dédoublement du spot des uroporphyrines. Ces méthodes ont donné lieu à un certain nombre de variations dans la composition du solvant (en particulier Bogorad et Granick, 129; et Michaelle et Komarkova, 130). En réalité, il a été démontré, et nous reviendrons ultérieurement sur ce point, que la séparation des isomères I et III de l'uroporphyrine n'est pas dépourvue de causes d'erreurs. On estime actuellement que le meilleur procédé de séparation des uroporphyrines I et III est celui utilisant en premier développement un mélange kérosène - chloroforme éthanolique (atmosphère chloroforme éthanolique) et en deuxième développement dans la même direction, le mélange kérosène - dioxanne (atmosphère dioxanne). Ce procédé dû à Cornford et Benson (131) tient compte de toutes les conditions qui peuvent

influencer la séparation et en particulier la pureté des solvants. Bien que la quantité d'esters utilisée ne soit pas supérieure à 2 microgrammes, on peut procéder à un dosage spectrométrique après élution des spots.

- Il faut noter de plus que les systèmes chromatographiques précédents séparent aussi les esters des porphyrines dicarboxyliques. Cette séparation est bien meilleure avec une autre technique de Chu (132).

- X -

T A U X N O R M A U X
D E S P O R P H Y R I N E S D A N S L E S
M I L I E U X B I O L O G I Q U E S

- URINES -

- Coproporphyrines.

Probablement surtout coproporphyrine III.
Chiffres extrêmes : 0 à 300 microgrammes par 24 h.
(11, 78).

- Uroporphyrines.

Probablement surtout uroporphyrine I.
Chiffres extrêmes : 0 à 40 microgrammes par 24 h (11),
chiffres moyens en général inférieurs à 10 microgrammes.

- Acide $\mathcal{S}$ aminolévulinique.

Environ : 300 microgrammes pour 100 ml
(40).

- Porphobilinogène.

Environ : 100 microgrammes pour 100 ml.
(40).

- Protoporphyrine.

Jamais éliminée par l'urine.

- FECES -

- Coproporphyrines.

Surtout coproporphyrine I.

Chiffres extrêmes : 0 à 50 microgrammes par gramme de poids sec (11).

100 à 1100 microgrammes par 24 h.

(Schwartz, 78).

- Uroporphyrines.

10 à 40 microgrammes par 24 heures (Schwartz, 78).

- Protoporphyrine.

Chiffres extrêmes : 0 à 113 microgrammes par gramme de poids sec (11).

- BILE -

- Coproporphyrines.

Chiffres extrêmes : 400 à 1000 microgrammes par 24 h (Schwartz, 78).

- Porphyrines totales.

3.000 à 3.500 microgrammes pour 1000, surtout coproporphyrines (2/3 à 3/4 de la quantité totale) le reste est constitué de proto-, deutéro- et mésoporphyrines (Gajdos, 10).

- GLOBULES ROUGES -

- Protoporphyrine libre.

En microgrammes pour 100 ml de globules rouges (Wranne, 86).

Adulte hommes : 16 à 52 μ g, moyenne 30 μ g.

femmes : 18 à 51 μ g, moyenne 37 μ g.

Enfants nouveaux-nés : moyenne 54 μ g.

âgés de 18 mois : moyenne 32 μ g.

- Coproporphyrines.

En microgrammes pour 100 ml de globules rouges. Probablement surtout coproporphyrine III (Wranne, 86).

Adultes hommes : 0,7 à 2,3 μ g, moyenne 1,3 μ g.

femmes : 0,3 à 2,3 μ g, moyenne 1,2 μ g.

Enfants nouveaux-nés : moyenne 2,8 μ g.

âgés de 18 mois : 0,8 μ g.

- Uroporphyrines. = 0.

- Acide $\mathcal{S}$ aminolévulinique et porphobilinogène : Taux non fixés. Existence douteuse.

- PLASMA -

- Porphyries totales.

Nature mal connue, probablement coproporphyrines (Wranne, 86). En microgrammes pour 100 ml:

Adultes : 0,4 à 1,5 μ g, moyenne : 0,8 μ g.

Nouveaux-nés : 0,7 à 3,2 μ g, moyenne : 1,5 μ g.

- Acide $\mathcal{S}$ aminolévulinique.

19 microgrammes pour 100 ml.

- Porphobilinogène.

Existence douteuse.

- X I -

EXAMENS DE LABORATOIRE
A PRATIQUER DANS LE
DIAGNOSTIC BIOCHIMIQUE
D'UNE PORPHYRIE

- EXAMENS D'ORIENTATION -

Recherche et dosage de l'acide δ aminolévulinique, du porphobilinogène, des coproporphyrines et des uroporphyrines dans les urines.

Ces examens orientent le diagnostic vers :

- une porphyrie congénitale,
- une porphyrie aiguë intermittente,
- une porphyrie génétique sud-africaine, en période de crise abdominale ou neurologique,
- une porphyrie cutanée dite de l'adulte.

- EXAMENS COMPLEMENTAIRES -

- Porphyrie congénitale :

Dosages des proto- et coproporphyrines dans les fécès.
Eventuellement dosages des porphyrines sanguines.

- Protoporphyririe érythropoïétique :

- dosages des proto- et coproporphyrines dans les fécès,
- dosage de la protoporphyrine des globules et du plasma.

- Porphyrie génétique sud-africaine : en période cutanée pure et en période de latence et pour la différenciation avec la porphyrie congénitale :

- dosages des proto- et coproporphyrines dans les fécès.

- Uroporphyrines urinaires et fécales :

- identification des isomères I et III indispensable toutes les fois que l'élimination dépasse les limites normales.

DEUXIEME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS



- I -

I N T R O D U C T I O N

Dans cette deuxième partie qui a trait à nos travaux personnels, nous exposons d'une manière détaillée les méthodes de dosages des porphyrines et de leurs précurseurs que nous utilisons habituellement pour les milieux biologiques.

Ces méthodes nous ont permis l'examen biochimique de trois cas de porphyries : une porphyrie cutanée dite de l'adulte et deux porphyries aiguës intermittentes, pour lesquelles nous donnons le mode opératoire suivi dans le but d'obtenir des cristaux d'esters octaméthyliques d'uroporphyrines. Ces cristaux nous serviront de matériel de travail. Il n'est pas possible en effet de se procurer dans le commerce des uroporphyrines pures. D'ailleurs, pour nos recherches personnelles nous préférons opérer sur des uroporphyrines extractives afin de rester dans les conditions normales des examens de biochimie clinique.

Pour ces cristaux d'esters nous faisons choix ensuite d'une méthode de détermination du pourcentage des isomères I et III destinée à servir de référence dans nos essais portant sur les uroporphyrines acides libres par différentes techniques chromatographiques (partage sur papier, sur couche mince, échange d'ions) et électrophorétiques.

Nous donnons enfin les raisons qui nous inclinent à conserver la méthode de Cornford et Benson pour l'analyse d'urines ou d'autres prélèvements peu riches en porphyrines.

TECHNIQUES UTILISEES

II.1 - DOSAGE DES PORPHYRINES ET DE LEURS PRECURSEURS

DANS L'URINE -

- RECUEIL DES URINES -

- Coproporphyrines et uroporphyrines : urines des 24 heures conservées en présence d'un cristal de thymol et à l'abri de la lumière dans un flacon entouré de papier noir.

- Porphobilinogène : urine fraîche. Si l'examen n'est pas pratiqué immédiatement, alcaliniser à pH 7-8 avec du carbonate de sodium et conserver les urines à l'obscurité à +4° C.

- Acide δ aminolévulinique : urine fraîche. Si l'examen n'est pas pratiqué immédiatement, acidifier à pH 4-6 et conserver les urines à l'obscurité à + 4° C. L'acide δ aminolévulinique peut ainsi se conserver environ 20 jours.

- DOSAGE DES COPROPORPHYRINES -

Méthode de H. Fischer modifiée par Harlay et Malangeau (46).

— Réactifs.

- Ether sulfurique sans peroxydes,
- Solution acéto-acétique pH 4,2. Mélanger à parties égales acide acétique et solution saturée d'acétate de sodium à 3 H₂O.
- Solution à 5 p 100 d'acétate de sodium à 3 H₂O.
- Acide chlorhydrique dilué à 5 p 100 (v/v).

— Mode opératoire.

Mesurer dans une ampoule à décantation :

urine	50 ml
solution acéto-acétique	20 ml
éther	75 ml

Agiter, soutirer la couche éthérée et faire encore 2 extractions avec 50 ml d'éther. Si la dernière solution éthérée présente encore une fluorescence rose aux U.V., continuer l'extraction. (Dans le cas de fortes éliminations, on a intérêt cependant à recommencer l'extraction sur une prise d'essai plus faible). Réunir les extraits éthérés et conserver l'urine pour le dosage des uroporphyrines.

Laver les extraits éthérés avec 10 ml d'acétate de sodium à 5 p 100. Soutirer la couche aqueuse et la conserver. Répéter ces lavages 3 fois avec 10 ml de solution. Les eaux de lavages sont ajoutées à l'urine déjà traitée par l'éther.

Les porphyrines sont extraites des li-
queurs éthérées par agitation avec HCl à 5 p 100 utilisé par fractions de 5 ml jusqu'à ce que la solution chlorhydrique ne présente plus de fluorescence. rose. Réunir les extraits chlorhydrique.

Les extraits chlorhydriques sont amenés à pH 4 avec la solution saturée d'acétate de sodium (vérifier au papier indicateur). Réextraire les coproporphyrines avec un égal volume d'éther puis un demi-volume d'éther en surveillant la fluorescence et en prolongeant l'extraction si nécessaire.

Les solutions éthérées réunies sont lavées avec 10 ml de solution d'acétate de sodium à 5 p 100 puis, extraites par des fractions de 5 ml de HCl à 5 p 100 jusqu'à ce que l'extrait chlorhydrique ne soit plus fluorescent. Réunir les extraits chlorhydriques et mesurer exactement leur volume total.

- Dosage spectrophotométrique.

Lire la densité optique à 402 m μ en cuve de 1 cm en vérifiant que le maximum d'absorption est bien à cette longueur d'ondes. Lire aussi la densité optique à 380 et 430 m μ .

Densité optique corrigée à 402 m μ =

$$\frac{2 \times \text{D.O. à 402} - (\text{D.O. à 430} + \text{D.O. à 380})}{1,835}$$

$$\text{Coproporphyrines E } \frac{1 \text{ mg } \%}{1 \text{ cm}} = 6,670$$

- Calcul.

Coproporphyrines en milligrammes par litre d'urine =

$$\frac{\text{D.O. à 402 corrigée} \times \text{Volume de sol. chlorhydrique} \times 1000}{6,67 \times 100 \times \text{Volume d'urine de départ}}$$

- DOSAGE DES UROPORPHYRINES -

Méthode de Dresel, Rimington et Tooth (50).

Lorsque l'urine contient des quantités anormales de porphobilinogène, on peut effectuer deux types de dosages :

- des uroporphyrines préformées,

- des uroporphyrines après transformation du porphobilinogène en porphyrines par chauffage 20 minutes à

pH 4,2 au bain-marie bouillant à l'obscurité. Le dosage est habituellement pratiqué sur ces urines.

- Réactifs.

- Cyclohexanone pure
- éther de pétrole (E.40-60° C.)
- acide chlorhydrique dilué à 5 p 100.

- Mode opératoire.

Le dosage est effectué sur un échantillon d'urine traité pour transformer le porphobilinogène ou non traité, sur lequel on pratique d'abord une extraction des coproporphyrines par la méthode précédente.

L'extraction des uroporphyrines est faite par conséquent sur l'urine débarrassée des coproporphyrines à laquelle on a ajouté les solutions d'acétate de sodium de lavages de l'éther. On ajuste le pH à 1,50 avec HCl (vérification au pH-mètre) et on fait une première extraction avec 50 ml de cyclohexanone. Après décantation si la cyclohexanone ne présente pas de fluorescence aux U.V., faire une deuxième extraction avec 50 ml. Si la cyclohexanone présente une fluorescence rose, on fait une troisième ou plusieurs autres extractions dans les mêmes conditions jusqu'à non fluorescence de la cyclohexanone.

Les solutions de cyclohexanone sont réunies et on ajoute 100 ml d'éther de pétrole par fractions de 100 ml de cyclohexanone. On épuise ensuite le mélange avec HCl à 5 p 100 utilisé par fractions de 5 ml jusqu'à ce que les extraits chlorhydriques ne soient plus fluorescents aux U.V. Réunir les extraits chlorhydriques et mesurer exactement leur volume total.

- Dosage spectrophotométrique.

Lire la densité optique à 405 m μ en cuve de 1 cm en vérifiant que le maximum d'absorption est bien à cette longueur d'ondes. Lire aussi la densité optique à 380 et 430 m μ .

Densité optique corrigée à 405 m μ =

$$\frac{2 \times \text{D.O. à } 405 - (\text{D.O. à } 430 + \text{D.O. à } 380)}{1,844}$$

$$\text{Uroporphyrines } E \frac{1 \text{ mg } \%}{1 \text{ cm}} = 6,517$$

- Calcul.

Uroporphyrines en milligrammes par litre
d'urine =

$$\frac{\text{D.O. à } 405 \text{ corrigée} \times \text{Volume de sol. chlorhydrique} \times 1000}{6,517 \times 100 \times \text{volume d'urine de départ}}$$

- Remarques.

Lorsque le taux trouvé est très élevé, le dosage peut être pratiqué directement sur l'urine diluée convenablement avec HCl 1,5 N.

- DOSAGE DU PORPHOBILINOGENE (PBG) ET DE L'ACIDE S AMI-

NOLEVULINIQUE (ALA).--

- Dosage direct du Porphobilinogène.

Ce dosage direct peut être pratiqué dans les cas de forte élimination avec le réactif d'Ehrlich préparé selon la formule suivante :

paradiméthylaminobenzaldéhyde	15 g
acide chlorhydrique	66 ml
acide acétique	194 ml

L'urine est saturée de sulfate d'ammonium pour éliminer l'urobilinogène. On filtre et dilue le

filtrat au 1/10 avec de l'eau distillée. A 2 ml d'urine diluée on ajoute 2 ml de réactif d'Ehrlich. La lecture est faite après 5 minutes exactement à 555 m μ en cuve de 1 cm en utilisant comme témoin solvant du réactif d'Ehrlich dilué au 1/2 avec de l'eau distillée.

$$\text{Complexe PBG-Ehrlich} \quad E \frac{1 \text{ mg } \%}{1 \text{ cm}} = 1,136$$

- Calcul.

La dilution finale de l'urine étant au 1/20.

PBG en milligrammes par litre = D.O.à 555 m μ x 176,06.

Le résultat peut être aussi exprimé en unités : une unité égale sensiblement 1/30 de milligramme.

Pour un dosage précis et spécifique du PBG il vaut mieux utiliser cependant, surtout pour les faibles éliminations, la méthode de Mauzerall et Granick.

- Dosage de PBG et ALA par la méthode de Mauzerall et Granick (68).

- Réactifs.

- Dowex 2x8, 200-400 mesh. Laver la résine à l'eau distillée par décantation jusqu'à ce que le surnageant soit clair. La résine est ensuite traitée dans une colonne avec une solution d'acétate de sodium 3 M jusqu'à ce que l'effluent ne donne plus la réaction des chlorure avec AgNO₃, puis, avec l'eau distillée jusqu'à neutralité au papier de tournesol. La résine activée, en présence de 2 fois son volume d'eau distillée, peut être stockée 3 à 4 mois en flacon bouché à la température du laboratoire.

- Dowex 50x8, 200-400 mesh. Séparer les particules les plus fines par mises en suspension dans l'eau

distillée et décantations successives. La résine est ensuite mélangée 2 fois son volume de NaOH 2 N, laissée au repos 20 heures, puis, lavée dans une colonne à l'eau distillée jusqu'à neutralité des eaux de lavages. On la traite alors avec un volume de HCl 4 N, puis, 6 volumes de HCl 2 N. La résine activée peut être conservée en présence de 2 fois son volume de HCl N en flacon bouché environ 3 à 4 mois à la température du laboratoire.

- Acide acétique N et 0,2 N

- Acétate de sodium 0,5 M

- Tampon acétate pH 4,6 :

acide acétique glacial	57 ml
acétate de sodium à 3 H ₂ O	136 g
eau distillée q s p	1000 ml

- Acétylacétone pure

- Réactif d'Ehrlich I :

paradiméthylaminobenzaldéhyde	2 g
acide chlorhydrique 6 N	100 ml

- Réactif d'Ehrlich II :

paradiméthylaminobenzaldéhyde	1 g
acide acétique glacial	30 ml
acide perchlorique à 70 p 100	8 ml

Après dissolution, diluer avec 50 ml de l'acide acétique glacial. Se conserve 6 heures environ.

- Mode opératoire.

Amener l'urine à un pH compris entre 4 et 7.

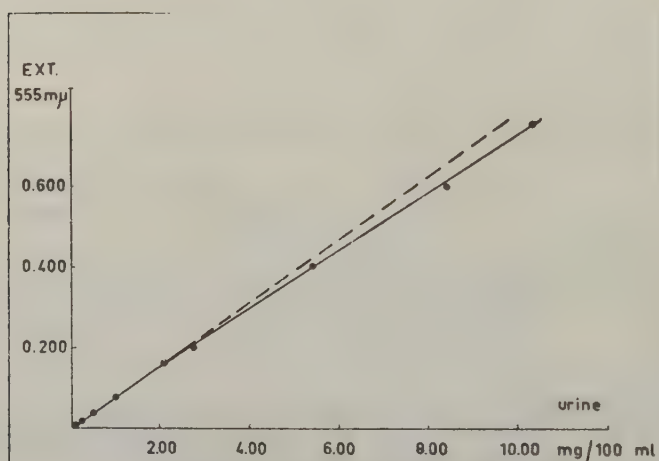
- PPG -

Introduire dans une colonne pour chromatographie de 1 cm de diamètre, la résine Dowex 2x8 sur une hauteur de 2 à 3 cm. Rincer avec environ 5 ml d'eau distillée. Ajouter au-dessus de la résine 1 ml d'urine et laisser s'écouler le liquide à la vitesse de 6 gouttes par minute. Laver 2 fois avec 2 ml d'eau distillée. L'effluent et les eaux de lavage réunis sont mis de côté pour la recherche de l'acide δ aminolévulinique.

Le PBG est ensuite élué avec 2 ml d'acide acétique N puis 2 ml d'acide acétique 0,2 N. Les éluats mélangés sont amenés au volume de 10 ml avec de l'eau distillée. A 2 ml de cette solution, ajouter 2 ml de réactif d'Ehrlich I. Mélanger. En présence de porphobilinogène il se développe une coloration rouge cerise.

La mesure est faite au spectrophotomètre après 5 minutes exactement à 555 m μ en cuve de 1 cm, en utilisant le réactif d'Ehrlich I dilué au demi avec de l'eau distillée comme témoin-solvant.

- Calcul.



d'après B.Haeger-Aronsen (40)

La loi de Beer est respectée jusqu'à $E \leq 0,200$.

$E \leq 0,200$: $12,6 \times E =$ milligrammes de PBG pour 100 ml d'urine.

$E > 0,200$: la courbe tracée par Haeger-Aronsen donne directement la teneur en milligrammes de PBG pour 100 ml d'urine.

- ALA -

Introduire dans une colonne pour chromatographie de 1 cm de diamètre, la résine Dowex 50 x 8 sur 2 à 3

cm de hauteur. Rincer avec 25 ml d'eau distillée. Faire passer sur cette colonne l'effluent et les eaux de lavages recueillis de la Dowex 2 x 8, à la vitesse de 6 gouttes par minute. Laver avec 30 ml d'eau distillée. Rejeter ces liquides.

Ajouter au-dessus de la résine 3 ml d'acétate de sodium 0,5 M. La coloration de la résine doit devenir plus claire sur les 3/4 de la hauteur mais pas sur toute la hauteur de la colonne. Ajouter encore 7 ml d'acétate de sodium 0,5 M. Recueillir l'éluat, ajouter 0,2 ml d'acétylacétone, bien mélanger et compléter à 10 ml avec le tampon pH 4,6. Porter au bain-marie bouillant 10 minutes et refroidir à la température du laboratoire. A 2 ml de la solution, ajouter 2 ml de réactif d'Ehrlich II. La réaction est positive lorsqu'il se développe une coloration rouge cerise.

La mesure est faite au spectrophotomètre après 15 minutes exactement à 553 m μ en cuve de 1 cm. Le témoin-solvant est constitué par 7 ml d'acétate de sodium 0,5 M traité de la même manière que l'éluat de Dowex 50 x 8.

- Calcul :

Pour E $\leq$ 1,200

4,74 x E = milligrammes de ALA pour 100 ml d'urine.

II.2 - DOSAGE DES PORPHYRINES DANS LES FECES -

Méthode de Schwartz, Berg, Bossenmaier et Dinsmore (78).

- Réactifs.

- Acétate d'éthyle pur Merk
- Acide acétique glacial pur

- Solution à 3 p 100 et à 10 p 100 d'acétate de sodium à 3 H₂O.
- Chloroforme pur Merck.
- Solution d'ammoniaque à 10 p 100 (v/v).
- HCl 1,5 N, HCl 0,3 N.

- Mode opératoire.

Les selles de 2 à 4 jours sont collectées et mélangées.

1/. 5 g de selles sont extraits quatre fois avec 50 à 75 ml du mélange :

acétate d'éthyle	4 parties
acide acétique	1 partie

Si une fluorescence de l'extrait persiste, poursuivre l'extraction. La séparation est facilitée par filtration sur verre fritté de porosité moyenne. Conserver le résidu solide.

2/. Les extraits acétate d'éthyle filtrés et mélangés sont lavés quatre fois avec 50 à 75 ml de solution d'acétate de sodium à 10 p 100. Le premier liquide de lavage contient 0,005 g d'iode p 100 ml. Dans certains cas de porphyrines, 8 ou 10 lavages sont nécessaires pour éliminer complètement les porphyrines uro-like (contrôle de la fluorescence). Ces solutions d'acétate de sodium sont conservées pour le dosage des uroporphyrines.

3/. Les porphyrines sont ensuite extraites de l'acétate d'éthyle par HCl 1,5 N jusqu'à ce que l'extrait ne soit plus fluorescent en U.V. Les solutions chlorhydriques mélangées sont diluées avec de l'eau pour obtenir une concentration en HCl de 0,15 N.

4/. On extrait alors avec le chloroforme les porphyrines dicarboxyliques en vérifiant la fluorescence des extraits. A ces extraits chloroformiques mélangés (ou à une partie aliquote) on ajoute 5 volumes d'acétate d'éthyle. Le mélange est lavé trois fois avec une solution d'acétate de sodium à 3 p 100 et la protopor-

pyrine et la deutéroporphyrine sont enlevées par extraction avec HCl 1,5 N jusqu'à non fluorescence. Cette solution chlorhydrique est conservée pour leur séparation.

5/. La solution chlorhydrique 0,15 N après extraction chloroformique contient les coproporphyrines. Deux cas peuvent se présenter : - la fluorescence est intense : diluer avec HCl 1,5 N et procéder au dosage direct ;
- la concentration est normale (fluorescence faible ou pas de fluorescence) : neutraliser avec l'acétate de sodium, ajouter 1/20 du volume d'acide acétique, extraire les coproporphyrines par l'acétate d'éthyle, épuiser les solutions acétate d'éthyle par HCl 1,5 N et effectuer le dosage sur la solution chlorhydrique totale.

Dosage des coproporphyrines : Dans l'un et l'autre cas, le dosage peut être pratiqué par spectrophotométrie comme les coproporphyrines urinaires ou par fluorométrie comparativement à un étalon de coproporphyrines.

6/. Dosage des uroporphyrines : le résidu solide de fécès provenant du premier temps de la technique est traité plusieurs fois par NH_4OH à 10 p 100. A cette solution ammoniacale totale on ajoute les solutions d'acétate de sodium de lavages du second temps de la technique. On procède sur ces solutions à l'extraction et au dosage des uroporphyrines tels qu'ils sont indiqués pour les uroporphyrines urinaires.

7/. La séparation de protoporphyrines et deutéroporphyrine est pratiquée d'une manière satisfaisante à partir des extraits chlorhydriques du quatrième temps de la technique. On neutralise avec l'acétate de sodium et réextraît complètement avec l'acétate d'éthyle. La deutéroporphyrine est récupérée de la solution par extraction avec HCl 0,3 N, puis, la protoporphyrine avec HCl 1,5 N. Le dosage de la protoporphyrine se fait par spectrophotométrie dans les mêmes conditions que la protoporphyrine des globules rouges.

II.3 = DOSAGE DES PORPHYRINES DES GLOBULES ROUGES ET DU

PLASMA

= DOSAGE DE LA PROTOPORPHYRINE LIBRE DES GLOBULES ROUGES =

Méthode de L. Wranne (86).

= Réactifs.

- = Acétate d'éthyle pur Merck contenant une trace d'EDTA.
- = Acide acétique glacial pur.
- = Solution à 3 p 100 d'acétate de sodium à 3 H₂O.
- = HCl 5 N, HCl 0,24 N.

= Mode opératoire.

On recueille sur héparine 10 à 15 ml de sang par ponction veineuse. On centrifuge 30 mn à 3.000 tours. Le plasma est séparé complètement et conservé si l'on désire y doser les porphyrines.

On prélève au moins 4 ml de globules que l'on mélange soigneusement avec 40 ml du mélange :

acétate d'éthyle	4 parties
acide acétique	1 partie.

Le précipité est trituré avec un agitateur de verre pendant 2 minutes. On filtre sur verre fritté en s'aidant d'un vide léger. Le précipité est lavé trois fois avec 10 ml du mélange acétate d'éthyle - acide acétique. Le troisième liquide de lavage est en général presque incolore. Les liquides de lavages et le filtrat sont mélangés.

L'extrait total acétate d'éthyle est lavé dans une ampoule à décantation trois fois avec 15 ml de solution aqueuse d'acétate de sodium à 3 p 100.

Les copro- et protoporphyrines sont extraites de l'acétate d'éthyle avec HCl 5 N que l'on utilise par fraction de 4 ml. On fait quatre extractions chlorhydriques.

Les liqueurs chlorhydriques mélangées sont neutralisées avec l'acétate de sodium cristallisé en utilisant un papier au rouge congo comme indicateur. On procède ensuite à trois extractions avec 50 ml d'acétate d'éthyle chaque fois.

Les solutions acétate d'éthyle mélangées sont lavées deux fois avec 3 ml d'eau distillée. Les eaux de lavages sont rejetées. Il est nécessaire d'attendre un temps suffisant pour obtenir une séparation nette des phases.

Les porphyrines sont enfin extraites de l'acétate d'éthyle :

- six fois avec des quantités de HCl 0,24 N de 4 ml chaque fois. Chacun de ces extraits chlorhydriques est recueilli séparément. Ils contiennent les coproporphyrines avec des traces de protoporphyrine. Le sixième extrait est considéré comme dépourvu de coproporphyrines. Dans le cas où une fluorescence rose persiste, continuer l'extraction dans les mêmes conditions.

- quatre fois avec des quantités de HCl 5 N de 4 ml chaque fois. Si une fluorescence rose persiste, continuer l'extraction. Les extraits chlorhydriques sont mélangés, ils contiennent la protoporphyrine.

- Dosages.

Les dosages des porphyrines doivent être exécutés dans le délai le plus bref, la conservation en solution chlorhydrique se faisant avec une perte importante de porphyrines.

- Dosage des Coproporphyrines par fluorométrie.

On doit utiliser un fluoromètre sensible, l'excitation étant faite à une longueur d'ondes de 400 m μ ou mieux 405 m μ et la mesure à 590-600 m μ , si possible en cuve de 5 cm.

Ce dosage est pratiqué sur chacun des extraits chlorhydriques, le dernier (le sixième en général) étant pris comme blanc. On doit opérer de plus comparative-ment à des solutions de coproporphyrines de 0 à 0,1 μ g par ml dans HCl 0,24 N. Le calcul se fait pour chacun des extraits chlorhydriques. Le chiffre de coproporphyrines totales correspond au volume de globules rouges de départ, le ramener à 100 ml de globules rouges. Le taux de récupération des coproporphyrines étant de 75 p 100 environ, le chiffre de coproporphyrines trouvé doit être multiplié par le facteur de correction 1,33.

- Dosage de la Protoporphyrine par spectrophotométrie.

Les lectures sont faites en cuves de 1 cm en utilisant comme blanc HCl 5 N, aux 3 longueurs d'ondes suivantes : 380, 411 et 430 m μ . On doit s'assurer que la longueur d'ondes maximum est bien 411 m μ .

Le calcul est le suivant :

$1,225 \times [2 \text{ D.O. à } 411 - (\text{D.O. à } 380 + \text{D.O. à } 430)] = X$ microgrammes de protoporphyrine par ml de solution chlorhydrique.

Si : S = volume de globules rouges de départ

V = volume de solution chlorhydrique 5 N de protoporphyrine

$$\frac{X \times V \times 100}{S} \times 1,25 = \text{Protoporphyrine en microgrammes pour 100 ml de globules rouges}$$

1,25 est un coefficient de correction, le taux de récupération de la protoporphyrine étant de 80 p 100.

Un dosage plus précis peut être fait en cuves de 5 cm, en tenir compte alors dans le calcul.

- DOSAGE DES UROPORPHYRINES DANS LES GLOBULES ROUGES -

Les uroporphyrines des hématies sont théoriquement extraites par l'acétate d'éthyle. Cependant,

dans la porphyrie congénitale où existe surtout l'isomère I, cette extraction est très incomplète et une quantité importante d'uroporphyrine demeure dans le culot protéique d'extraction d'où on peut l'extraire par NH_4OH à 10 p 100.

Par conséquent, on pourra doser les uroporphyrines en utilisant certaines étapes de la technique mise au point par Wranne pour le dosage de la protoporphyrine libre et des coproporphyrines.

Le résidu protéique d'extraction par le mélange acétate d'éthyle - acide acétique est extrait complètement avec NH_4OH à 10 p 100. A la solution filtrée, on ajoute les solutions d'acétate de sodium à 3 p 100 ayant servi à laver l'extrait acétate d'éthyle. Le mélange est amené à pH 1,5. Les uroporphyrines sont extraites ensuite par la cyclohexanone selon la technique de Dresel, Rimington et Tooth (50) comme pour l'urine.

- DOSAGE DES PORPHYRINES DANS LE PLASMA -

Les techniques précédentes sont applicables.

La nature exacte des porphyrines présentes à l'état normal étant mal définie, ce dosage ne présente d'intérêt que dans les grandes porphyrinémies (plasma fluorescent aux U.V.).

III

PREPARATION D'ESTERS OCTAMETHYLIQUES D'UROPORPHYRINES A PARTIR DE L'URINE

Nous utilisons la méthode de séparation proposée par Comfort, Moore et Weatherall (111) parce qu'elle se prête aussi bien à un travail portant sur des quantités de plusieurs litres d'urine que sur de faibles échantillons.

On recueille les urines de plusieurs jours consécutifs. Ces urines sont mélangées et lorsqu'elles contiennent du porphobilinogène en quantités anormales (porphyrie aiguë), on les acidifie à pH 4,2 avec de l'acide chlorhydrique puis on les chauffe au bain-marie bouillant pour transformer le porphobilinogène en porphyrines.

ADSORPTION SUR TALC

Plusieurs litres d'urines chauffées ou non, sont amenés à pH 2,5-3,0 avec l'acide chlorhydrique et traités avec du talc à raison de 10 g de talc environ par litre d'urine. Ce traitement se fait par simple agitation, décantation et filtration sur bûchner. On répète l'opération avec du talc neuf jusqu'à ce qu'il ne présente plus de fluorescence rose aux U.V.

Le talc est essoré complètement sur bûchner puis séché en couche mince à l'étuve à 37° C. Les porphyrines se conservent bien sous cette forme adsorbée

à l'obscurité à la température du laboratoire.

Une petite portion de ce talc est éluée par NH_4OH 2 N. L'éluat est chromatographié sur papier dans la lutidine afin de noter l'ensemble des porphyrines éliminées et en particulier des porphyrines autres que octa- et tétracarboxyliques.

- ESTERIFICATION -

L'estérification est pratiquée directement sur le talc bien sec. Pour les urines étudiées, nous avons utilisé une fois le méthanol saturé d'acide chlorhydrique gazeux et les autres fois, du méthanol contenant 5 p 100 (v/v) d'acide sulfurique. Dans tous les cas, le talc est laissé 12 à 20 heures à l'obscurité à la température du laboratoire en présence du mélange estérifiant à raison de 100 ml pour 100 g de talc.

Le talc est ensuite filtré sur büchner, puis remis en suspension à plusieurs reprises dans le méthanol et filtré. Les solutions méthanoliques de lavages sont ajoutées au premier filtrat. L'ensemble des solutions alcooliques d'esters méthyliques est additionné d'eau afin d'abaisser le titre alcoolique et permettre l'extraction des esters par le chloroforme. Cette extraction chloroformique est pratiquée sans délai pour éviter l'hydrolyse des esters et poursuivie jusqu'à ce que le chloroforme soit incolore et non fluorescent. Les extraits chloroformiques réunis sont alors lavés rapidement une fois avec une solution de NaOH à 2 p 100 puis plusieurs fois à l'eau distillée jusqu'à neutralité des eaux de lavages. La solution chloroformique est enfin filtrée sur papier. On l'évapore sous vide à une température inférieure à 40°C . Le résidu est séché dans le vide sur actigel.

- CHROMATOGRAPHIE SUR ALUMINE -

Alumine Merck ou Prolabo standardisée selon Brockman. L'alumine est mise en suspension dans l'eau,

filtrée et séchée en couche mince à 20° C pour l'alumine d'activité IV et à 120° C pour l'alumine d'activité II.

Les solvants doivent être très purs :

- Benzène Merck,
- Chloroforme Merck lavé cinq fois avec 2 volumes d'eau distillée séché sur chlorure de calcium et conservé à l'obscurité (conservation environ 3 jours).
- Ether de pétrole redistillé : fraction 40-60° C.
- Méthanol absolu Merck.

Chromatographie.

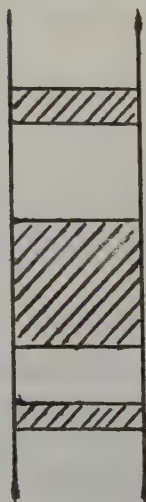
Nous avons utilisé des colonnes de verre de 20 cm de hauteur et de 1,5 cm de diamètre intérieur et des colonnes plus petites de 20 cm de hauteur et 1 cm de diamètre intérieur. Le résidu sec d'esters méthyliques est dissous dans le solvant convenable.

Pour la première chromatographie, nous avons employé l'alumine IV et le mélange solvant benzène-chloroforme 1/1 (v/v). Le développement du chromatogramme était effectué avec le même solvant ou le mélange benzène-chloroforme 1/3 jusqu'à séparation satisfaisante des zones de porphyrines repérées aux U.V. Schématiquement ce premier chromatogramme présente l'aspect suivant :

zone supérieure brunâtre →
(pigments divers, porphyrines non
estérifiées)

zone intermédiaire rouge →
en général assez large (uroporphyrines)

zone inférieure rouge →
relativement mince (coproporphyrines)



Dans les urines de porphyries, le chromatogramme est compliqué par la présence d'autres zones dues à des esters de porphyrines à 7, 6, 5, 3 groupements carboxyliques. Il est par conséquent indispensable de procéder à une deuxième chromatographie pour purifier en particulier, la zone correspondant aux uroporphyrines.

L'élution des zones peut être conduite de deux manières : — soit par addition continue du solvant benzène-chloroforme 1/3 de développement et collection de chacune des fractions, si les zones sont bien séparées ;
— soit, après avoir retiré avec une longue spatule chacune des zones de la colonne, éluer avec un mélange chloroforme (95 ml) — méthanol (5 ml).

Les éluats correspondant aux différentes zones sont évaporés sous vide à siccité. Dans le cas de fortes éliminations de porphyrines, une cristallisation des esters peut se produire à ce stade, ce qui évite la deuxième chromatographie.

La deuxième chromatographie est effectuée soit sur alumine IV avec les solvants benzène-chloroforme 1/1 puis chloroforme-méthanol 100/1 ; soit, sur alumine II avec les solvants éther de pétrole-chloroforme 4/1 puis éther de pétrole-chloroforme 1/1. Lorsque les zones sont bien séparées, elles sont éluées comme précédemment et chaque zone est soumise à la chromatographie sur papier dans la lutidine après hydrolyse par HCl 7 N 36 heures, pour identification et vérification de la pureté.

- CRISTALLISATION DES ESTERS METHyliques -

Les esters méthyliques peuvent cristalliser même à partir de solutions assez impures. Nous opérons de la manière suivante. Lorsque l'éluat d'une zone de chromatogramme cristallise à l'évaporation, on évapore sous vide à sec. Le résidu est repris par une petite quantité de chloroforme, transféré dans un tube à centrifuger. Le tube est porté au bain-marie vers 50° C et on ajoute un égal volume de méthanol absolu. Sous un

léger courant d'azote le chloroforme s'évapore et les esters cristallisent brusquement. On centrifuge, le culot d'ester est repris par le chloroforme-méthanol comme précédemment. Les cristaux bien formés sont recueillis et essorés sur un petit büchner. On peut les laver avec quelques gouttes de méthanol absolu froid.

- HYDROLYSE DES ESTERS -

Les esters sont hydrolysés dans de petits tubes bouchés hermétiquement avec HCl aqueux 7 N pendant 36 à 48 heures à l'obscurité et à la température du laboratoire. Le temps de 36 heures est suffisant en général, cependant, en ce qui concerne les porphyrines octacarboxyliques, il vaut mieux adopter un temps de 48 heures pour obtenir une hydrolyse totale.

L'acide chlorhydrique est ensuite éliminé complètement dans le vide en présence de pastilles de KOH. Tout autre procédé d'évaporation, et en particulier l'utilisation d'un courant d'azote, est à proscrire en raison du risque de décarboxylation et de destruction partielles des porphyrines (traînées et spots multiples sur les chromatogrammes-papier).

Le résidu sec est repris par une petite quantité de NH_4OH 2 N pour la chromatographie sur papier des porphyrines libres dans la lutidine.

- CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER DES PORPHYRINES LIBRES -

Pour l'identification des porphyrines et la vérification de la pureté des fractions chromatographiques d'alumine, nous opérons habituellement dans les conditions suivantes :

Papier Whatmann N° 1 dans le sens de la machine.

Solvant :

2,6 Lutidine 5 parties

eau distillée 3 parties

Chromatographie ascendante, longueur 30 cm, temps environ 20 heures. Obscurité totale. Température 20-24° C.

Quantités de porphyrines déposées : 1 à 5 microgrammes (solutions de porphyrines libres dans NH_4OH 2 N).

Témoins internes et externes de porphyrines pures (solutions de porphyrines libres dans NH_4OH 2 N).

Contrairement à Ericksen (94) nous n'utilisons pas d'atmosphère d'ammoniaque.

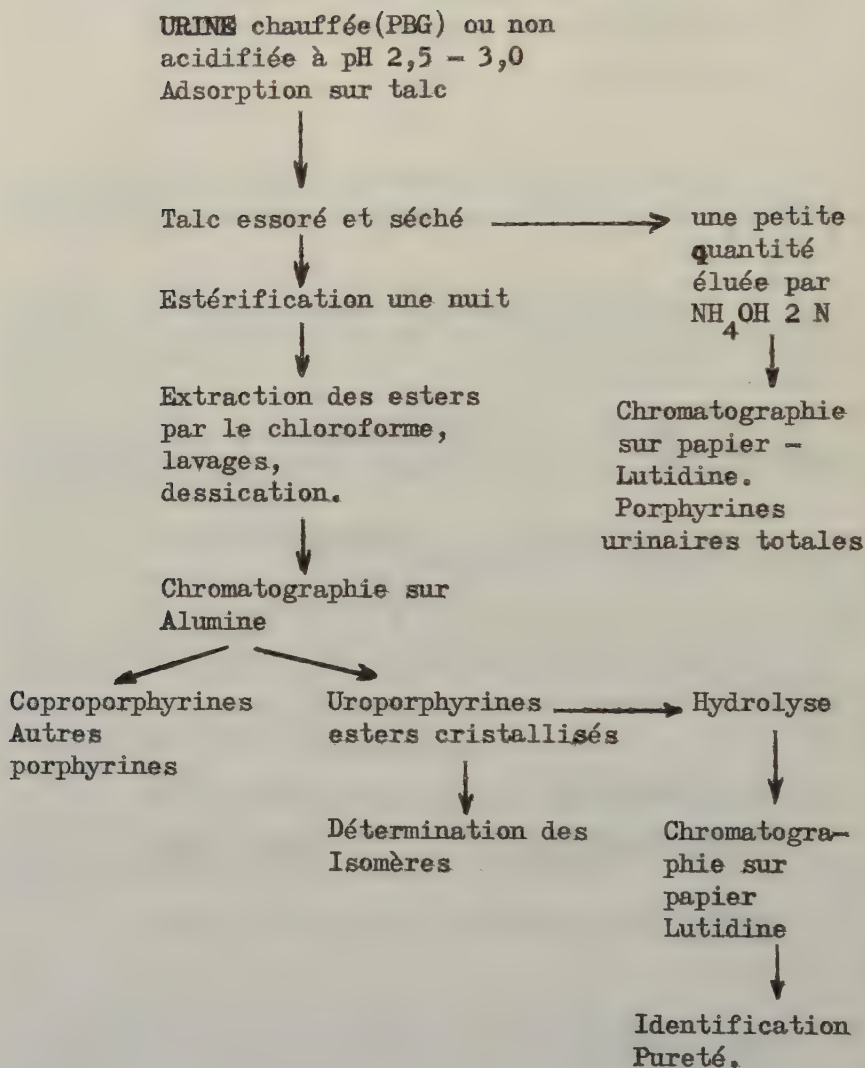
Les valeurs des R_F les plus fréquemment trouvées sont :

uroporphyrines 0,08 - 0,10

coproporphyrines 0,50 - 0,60

porphyrines dicarboxyliques 0,70 - 0,80

- RESUME -



- I V -

APPLICATIONS A DES URINES DE PORPHYRIES

- PREPARATION D'ESTERS OCTAMETHYLIQUES D'UROPORPHYRINES

ETALONS -

IV.1 - PORPHYRIE CUTANEE DITE DE L'ADULTE -

Malade MAT... femme de 54 ans présentant une lésion bulleuse formée de bulles de petites dimensions siégeant sur le visage, les mains, les jambes, laissant une cicatrice atrophique blanchâtre. On note une pigmentation de teinte brune au niveau des pommettes et du front.

L'éthylisme est certain, l'atteinte hépatique discrète.

L'urine est de coloration rouge sombre, fluorescente. Les taux de porphyrines urinaires sont les suivants :

- Porphobilinogène = 0
- Coproporphyrines : 4,25 mg p 1000
- Uroporphyrines : 38,8 mg p 1000

Les cristaux d'esters méthyliques d'uroporphyrines obtenus ont un point de fusion de 272° C.

IV.2 - PORPHYRIES AIGUES INTERMITTENTES -

- 1/. Malade VET..., femme de 27 ans présentant depuis deux ans environ des poussées successives de douleurs abdominales. A l'une de ces crises particulièrement forte, on opère la malade pour appendicite aiguë. Apparurent ensuite des troubles psychiques nécessitant un séjour dans une clinique psychiatrique, puis une période de rémission de quelques mois rendant la malade à une vie presque normale, suivie de nouvelles douleurs abdominales intenses faisant place à des parésies des quatre membres, une paralysie respiratoire partielle, une température à 38° et un état d'abattement marqué.

L'urine est de coloration normale à l'émission. Elle contient :

- Porphobilinogène : 160 mg p 1000, sur l'urine fraîche
- Coproporphyrines : 9 mg p 1000
- Uroporphyrines : 20 mg, taux moyen de plusieurs jours après transformation des précurseurs.

Les cristaux d'esters méthyliques d'uroporphyrines obtenus ont un point de fusion de 260-261°C.

- 2/. Malade FLA..., femme de 32 ans. Elle a présenté depuis environ un an de violentes douleurs abdominales qui ont incité à faire d'urgence une intervention chirurgicale. L'anesthésie faite au penthotal a déclenché des troubles neurologiques majeurs : paralysie des membres supérieurs et inférieurs, avec insuffisance respiratoire motrice, accompagnés de troubles psychiques importants, de troubles métaboliques et hypothermie.

Comme le cas précédent, il s'agit d'une pyrroloporphyrie typique. L'urine présente une coloration normale. Elle contient en moyenne :

- Porphobilinogène : 81,1 mg p 1000, sur l'urine fraîche.

— Acide aminolévulinique : 1 mg p 1000, sur l'urine fraîche.

Les taux de porphyrines sont difficiles à définir en raison de l'incontinence totale.

— Coproporphyrines : de 0,150 à 0,870 mg p 1000.

— Uroporphyrines : de 1,44 à 77 mg p 1000 après transformation des précurseurs. Un dosage pratiqué ultérieurement sur un échantillon d'urines des 24 heures a montré : uroporphyrines préformées 2,72 mg p 1000 et uroporphyrines après transformation des précurseurs 19,3 mg p 1000.

Les cristaux d'esters méthyliques d'uroporphyrines obtenus ont un point de fusion de 256° C.

- V -

METHODES DE DETERMINATION
 QUANTITATIVE DES ISOMERES
 I ET III DE L'UROPORPHYRINE
 ESTERIFIEE

Nous avons rappelé les méthodes de séparation qualitative des isomères de l'uroporphyrine. Lorsque l'on est en possession de cristaux d'esters octaméthyliques, dont on sait qu'ils sont toujours formés par les deux isomères, le pourcentage relatif de ceux-ci dans le mélange pourrait être déterminé par le point de fusion ou une séparation chromatographique. L'expérience montre que les résultats obtenus ne sont pas toujours concordants.

V.1 - POINT DE FUSION DES ESTERS METHYLIQUES -

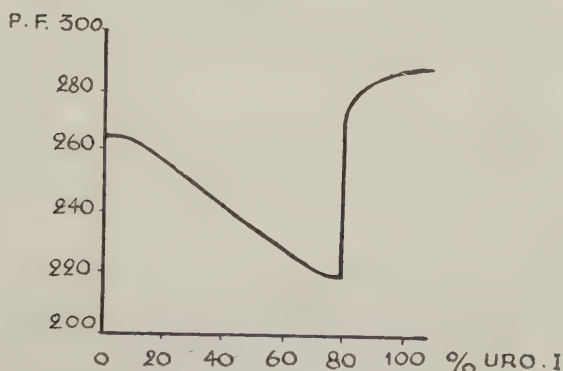
Différents auteurs (24, 25) avaient signalé que le point de fusion est d'un intérêt tout à fait limité pour une connaissance exacte de la répartition des isomères. Jope et O'Brien (113) d'une part, Nicholas et Rimington (114) d'autre part, l'ont démontré en traçant la courbe des points de fusion de mélanges connus d'uroporphyrine I et d'uroporphyrine III.

Cette courbe passe par un minimum pour un eutectique de composition :

uroporphyrine I 75 p 100

uroporphyrine III 25 p 100
 (P.F. 222° C).

d'après JOPE et O'BRIEN



Lorsque l'isomère III prédomine, pour de faibles variations du point de fusion (par exemple entre 250 et 260° C.) on peut avoir de grandes variations dans la distribution des isomères. Si bien que le point de fusion constitue au maximum une indication sur la présence prédominante d'un isomère.

V.2 - SEPARATION QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES ISO-

MERES I ET III DE L'UROPORPHYRINE ESTERIFIÉE, PAR

CHROMATOGRAPHIE --

La chromatographie sur papier conduit à des résultats meilleurs que la prise du point de fusion. C'est à elle que nous avons eu recours dans le choix d'une méthode de référence pour l'analyse qualitative et quantitative des isomères.

Nous avons effectué des essais comparatifs dans des conditions opératoires identiques selon la méthode de Falk et Benson (128) et la méthode de Cornford et Benson (131).

MATERIEL

- Cuves de verre parallélépipédique de 200 x 200 x 90 mm à couvercle rodé percé d'une ouverture centrale pour introduire le solvant après saturation.

- Papier Whatman N° 1. Feuilles de 150 x 150 mm roulées en cylindres.

SOLVANTS

- Chloroforme Merck lavé trois fois à l'eau distillée, séché sur chlorure de calcium, filtré et additionné de 1 p 100 (v/v) d'éthanol absolu. Se conserve environ 3 jours.

- Dioxanne Merck purifié selon Eigenberger (133) et Cornford et Benson (131). Le dioxanne est porté à l'ébullition à reflux pendant 7 heures avec 120 ml de HCl à 4 p 100 (p/v) par litre. Les peroxydes sont éliminés par agitation du mélange avec un excès de sulfite de sodium cristallisé. Un peu de KOH en pastilles est ensuite ajouté : il se forme un précipité blanc que l'on élimine par décantation et filtration. Les agitations avec KOH sont répétées jusqu'à ce qu'il ne se forme plus de phase aqueuse. Le dioxanne est séché sur sodium et distillé. On recueille la fraction 101-103°C. Il peut encore contenir des impuretés aldéhydiques que l'on élimine par congélation fractionnée : on utilise la fraction fondant à 11°5 C. Ce dioxanne pur est conservé au réfrigérateur en flacons jaunes à l'obscurité à + 4° C.

- Kérosène Serlabo : E 190-250° C.

CONDITIONS OPERATOIRES

- Chromatographie ascendante

- Température 20-22° C.

- Obscurité.

- ETALONS D'UROPORPHYRINES UTILISES -

- Ester octaméthylque d'Uroporphyrine I pur, F 292° C, donnant uniquement la coproporphyrine I par décarboxylation. Collection du Professeur C.Rimington(*) = Etalon URO.I.

- Ester octaméthylque d'Uroporphyrines de porphyrine cutanée dite de l'adulte. F. 272° C. = Etalon "MAT".

- Esters octaméthylques d'Uroporphyrines de porphyrines aiguës intermittentes :

Etalon "VET" F 260-261° C.

Etalon "FLA" F 256° C.

Ces esters sont utilisés en solution dans le chloroforme lavé et séché : 1 ml = 1 ~~mg~~ g.

V.2.1 - METHODE DE FALK ET BENSON -

Dans un angle de la feuille de papier, à 2 cm de chaque bord, on dépose l'ester à chromatographier sous forme d'un spot rond de 2 à 3 mm de diamètre. Le papier est ensuite roulé en cylindre.

- Première chromatographie.

La cuve contenant le cylindre de papier est mise à saturer avec du chloroforme éthanolique 5 mm puis on introduit par l'ouverture centrale du couvercle le mélange solvant :

kérosène	4 ml
chloroforme éthanolique	6 ml

Lorsque le solvant a parcouru environ 50 mm à partir du

(*) Nous remercions respectueusement le Professeur Rimington de Londres, d'avoir bien voulu nous donner cet étalon.

point de dépôt de l'ester (temps 15 - 20 mn), on retire le papier et sèche 5 mn exactement à 90-100° C. puis 15 mn dans un courant d'air.

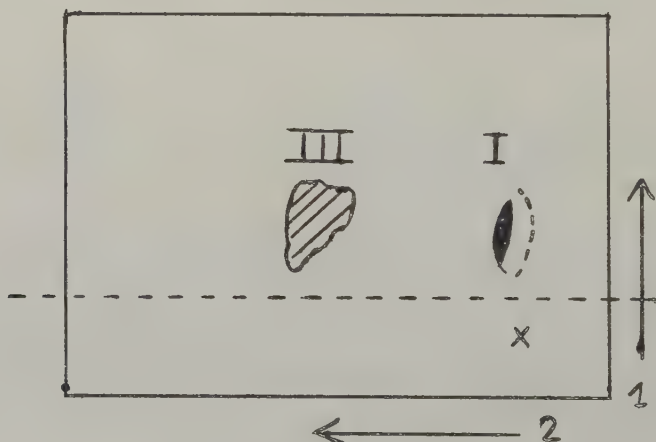
On repère aux U.V. la position du spot de porphyrines en marquant le contour d'un trait de crayon. La tache est allongée, sans distinction des isomères. Cette première chromatographie a pour but de séparer les impuretés (en particulier les porphyrines non estérifiées) qui restent sur le point de départ. A 0,5 cm environ au-dessous du spot de porphyrines on coupe le papier pour éliminer les impuretés.

- Deuxième chromatographie.

Elle est pratiquée dans la 2e dimension avec le solvant :

kérosène	8 ml
dioxanne	3 ml

que l'on introduit après avoir laissé la cuve et le papier se saturer 15 mn en atmosphère de dioxanne.



On laisse le solvant parcourir une longueur de l'ordre de 70 mm environ à partir du spot d'uroporphyrines (temps 30 mn environ). On retire la bande et on la sèche comme précédemment.

Dans ces conditions, on constate aux U.V. que le spot initial a retenu une fluorescence plus ou moins importante formant une tache petite, c'est l'uroporphyrine I de migration à peu près nulle. L'uroporphyrine III se trouve à un R_F de 0,50 environ sous forme d'une tache allongée et sinueuse peu fluorescente. Les meilleures séparations sont obtenues avec des quantités d'esters comprises entre 0,5 et 1,5 μ g.

Le calcul du pourcentage des isomères I et III est fait par planimétrie de la surface de la tache fluorescente après le premier et après le deuxième développement chromatographique.

V.2.2. - METHODE DE CORNFORD ET BENSON -

Le mode opératoire est très voisin, les solvants changent dans leurs proportions respectives, la chromatographie est unidimensionnelle.

- Première chromatographie.

Le solvant :

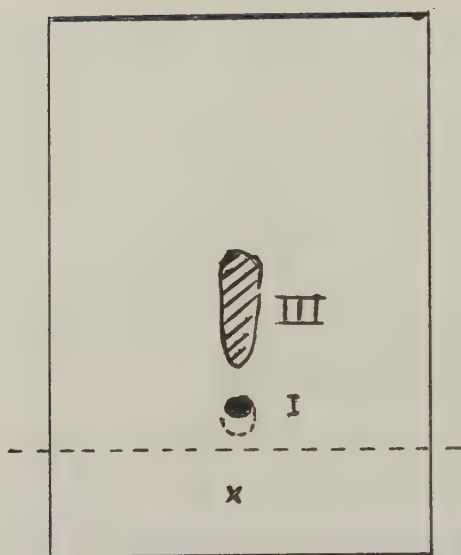
kérosène	4 ml
chloroforme éthanolique	6 ml

est introduit après 15 à 30 mm de saturation de la cuve et du papier avec 10 ml de chloroforme éthanolique. Après que le solvant a parcouru 40 mm à partir du point de dépôt (temps 15-20 mm), le papier est séché, la tache fluorescente est marquée d'un trait de crayon. On découpe le papier à environ 0,5 cm au-dessous du spot d'uroporphyrines pour éliminer les impuretés. Il n'y a pas de séparation des isomères.

- Deuxième chromatographie.

Elle a lieu dans la même dimension. Après saturation de la cuve et du papier pendant 15 à 30 mm avec 7 ml de dioxanne, on introduit le solvant suivant:

kérosène	4 ml
dioxanne	1 ml



Lorsque le solvant a atteint le sommet de la feuille (temps environ 60 mn), on sèche le papier à 90-100° C et 30 mn dans un courant d'air. Les taches sont repérées aux U.V. et marquées d'un léger trait de crayon. Le calcul des R_F est fait en prenant comme ligne de base le centre du spot après la première chromatographie :

Uroporphyrine I = 0

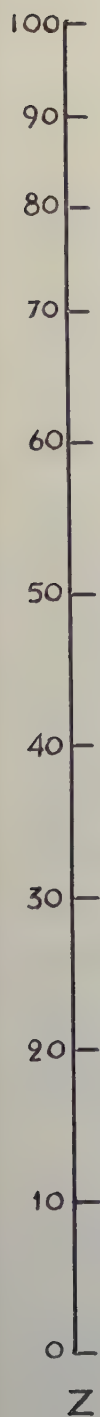
Uroporphyrine III = 0,25-0,30.

Les meilleurs séparations sont théoriquement obtenues avec des quantités d'esters allant de 0,3 à 1,5 g.

et III. == Calcul du pourcentage des uroporphyrines I

Les spots sont découpés et élués séparément pendant une heure en agitant de temps en temps, avec 3 ml de chloroforme fraîchement lavé et sec. Les mesures sont faites au spectrophotomètre en cuves de 1 cm :

NOMOGRAPHE DE CORNFORD ET BENSON



$$\mu\text{g d'ester} = \left[2 \text{ D.O. à } 405-406 - (\text{D.O. à } 430 + \text{D.O. à } 380) \right] \times 2,721 \times V.$$

V = Volume de chloroforme utilisé.

Ce calcul donne le pourcentage apparent d'uroporphyrine I contenue dans l'ester chromatographié. En effet, en utilisant des mélanges en proportions connues d'esters d'uroporphyrine I et d'uroporphyrine III, Cornford et Benson ont montré que le rendement à l'élution peut varier de 50 à 100 p 100 (moyenne 70 p 100) pour des quantités totales d'esters élués allant de 0,4 à 1,2 μg . La cause demeure inexpliquée. Le calcul du pourcentage des isomères d'un mélange est bien plus précis cependant si on l'exprime par rapport à la quantité d'isomères I et III élués plutôt que par rapport à la quantité totale déposée.

D'une série de chromatogrammes portant sur des mélanges d'isomères I et III connus, déposés en quantités connues (1 μg), Cornford et Benson ont tiré une expression mathématique permettant de calculer le pourcentage réel d'uroporphyrine I dans un mélange avec une précision de 7 p 100 (erreur moyenne 2,2 p 100), lorsque ce pourcentage est compris entre 17 et 100 p 100.

Le nomographe expérimentalement établi est suffisant pour l'usage en biochimie clinique. Son efficacité tombe pour des teneurs en uroporphyrine I comprises entre 90 et 100 p 100.

Le calcul est valable seulement pour le papier Whatman N° 1.

Les résultats sont plus précis lorsque la quantité totale d'esters élués est voisine de 1 μg .

NOMOGRAPHE DE CORNFORD ET BENSON (voir p. 105) :

Nomographe pour la correction des rapports des isomères d'uroporphyrine trouvés par élution. Joindre " μg d'esters totaux (I+III) élués" (échelle x) avec "pourcentage apparent d'isomère I trouvé par élution" (échelle y) et lire "le vrai pourcentage d'isomère I" (échelle z).

- VI -

CHOIX D'UNE METHODE
DE REFERENCE POUR LA
DETERMINATION DES ISOMERES I
ET III DE L'UROPORPHYRINE
ESTERIFIEE

VI.1 - METHODE DE CORNFORD ET BENSON -

On a reproché à la méthode de Falk et Benson son imprécision lorsque les mélanges d'uroporphyrines I et III analysés contiennent des proportions très différentes de chacun des isomères. Il y a à la fois entraînement et rétention partiels de l'un dans l'autre (Bogorad et Marks, 134). De plus, la séparation est influencée par la quantité totale déposée. Enfin, elle souffre d'un manque de précision dans les détails techniques et dans le calcul du pourcentage des isomères.

La méthode de Cornford et Benson, en tenant compte des travaux de Bogorad et Marks et en s'appuyant sur un contrôle expérimental par décarboxylation en coporphyrines, demeure actuellement la seule méthode sûre de détermination du pourcentage des isomères I et III d'esters d'uroporphyrine à la condition d'observer un mode opératoire rigoureux.

Nous l'avons adopté comme méthode de référence. Elle a l'avantage de permettre d'effectuer simultanément plusieurs analyses en présence de témoins.

Cependant, au cours d'essais poursuivis avec nos différents esters étalons et des solvants, bien purifiés, nous avons constaté qu'il était nécessaire dans nos conditions d'expériences de faire varier la quantité de dioxanne du 2e solvant de développement.

Les mélanges kérosène/dioxanne suivants ont été utilisés :

kérosène ml		4	4	4	4
dioxanne ml	a/	b/	c/	d/	
	1	1,1	1,25	1,50	

les mélanges a/ et b/ donnent une séparation insuffisante des uroporphyrines I et III; le mélange d/ conduit à un léger entraînement de l'uroporphyrine I pure.

Nous avons opté pour le mélange :

c/ kérosène 4 ml
dioxanne 1,25 ml,

qui pour des quantités totales d'esters élués comprises entre 0,4 et 1,2 g nous donne les meilleurs résultats en laissant un spot d'uroporphyrine I bien délimité et sans tendance à être entraîné.

Il est nécessaire de lire les densités optiques avec un spectrophotomètre très sensible. Nous avons utilisé le spectrophotomètre Unicam SP 700. Les densités optiques déterminées étant faibles (de l'ordre de 0,100) de meilleurs résultats pourraient être obtenus avec élution par 1 ml de chloroforme et lecture en microcuve.

VI.2 - RESULTATS OBTENUS POUR LES ETALONS UTILISES -

Nous rapportons ici les pourcentages d'uroporphyrine I et d'uroporphyrine III obtenus pour nos quatre échantillons d'esters octaméthyliques cristallisés:

- par comparaison des points de fusion de ces esters avec les mélanges "synthétiques" de Jope et O'Brien (113);

- par chromatographie selon Falk et Benson d'une part et Cornford et Benson d'autre part. Les chiffres sont les moyennes données par cinq déterminations pour chaque ester, avec les deux méthodes, pour des quantités comprises entre 0,4 et 1,2 g.

ETALONS	Joje et O'Brien	Falk et Benson moyennes		Cornford et Benson moyennes	
	uropor- phyrine p 100	uropor- phyrine p 100		uropor- phyrine p 100	
	I	I	III	I	III
Uro.I F 292°	—	100	0	100	0
MAT. F 272°	80-82	78	22	77	23
VET. F 260-261°	15	15	85	18	82
FLA. F 256°	15-20	10	90	12	88

En tenant compte des résultats donnés par les méthodes de Cornford et Benson, nous assignons à nos esters octaméthyliques étalons la composition suivante :

	<u>P.F.</u>	<u>Uro.I</u>	<u>Uro.III</u>
Ester d'uroporphyrine I pur Rimington	292°C	100 %	0
Ester d'uroporphyrine de porphyrie cutanée "MAT"	272°C	77 %	23 %
Ester d'uroporphyrine de porphyrie aiguë "VET"	260-261°C	18 %	82 %
Ester d'uroporphyrine de porphyrie aiguë "FLA"	256°C	12 %	88 %

- VII -

ESSAIS DE SEPARATION DES
ISOMERES I ET III DE
L'UROPORPHYRINE LIBRE PAR
D'AUTRES SOLVANTS

VII.1

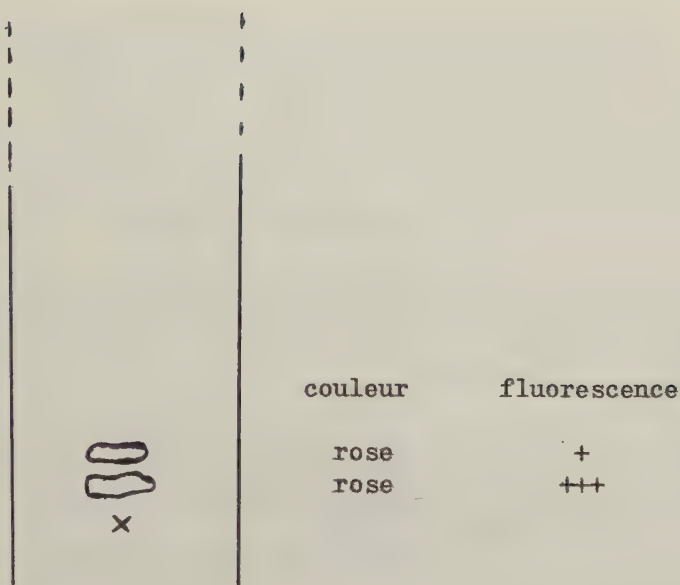
VII.1.1. - OBJET DES RECHERCHES -

La chromatographie sur papier des porphyrines libres dans la lutidine d'après le principe initial de Nicholas et Rimington (91, 92) ou de Ericksen (94) et avec les modifications qui lui ont été apportées (93,95), est à l'origine de la formation pour les uroporphyrines d'un spot double signalé par divers auteurs (87,94).

Nous avons également observé très fréquemment ce phénomène, que l'on opère aussi bien sur des uroporphyrines pures provenant d'esters cristallisés que sur des éluats de talc obtenus à partir d'urines chauffées (PBG, porphyrines aiguës) ou non chauffées.

Nous avons donné (page 92) les conditions selon lesquelles nous pratiquons habituellement une chromatographie sur papier avec le solvant : 2,6 lutidine (5 parties) - eau (3 parties). Le double spot présente l'aspect de deux petites taches plus ou moins étirées horizontalement, séparées par une étroite bande claire.

Au cours de la caractérisation des uroporphyrines libres d'urines de porphyrines aiguës ou de porphyrines cutanées, il nous était apparu que l'intensité relative de la fluorescence des deux taches pouvait être



assez variable et correspondait par hasard, grossièrement au pourcentage des isomères I et III déterminé ultérieurement sur les esters méthyliques. Etant donné le faible déplacement des uroporphyrines (R_F moyen = 0,10) et la séparation très minime de ces deux taches, il était difficile de vérifier s'il s'agissait vraiment d'une séparation des isomères ou si l'on était en présence d'une autre porphyrine.

Récemment ont été définies les conditions selon lesquelles on obtient une séparation valable des isomères I et III des coproporphyrines par chromatographie avec la 2,6 lutidine sur couche mince (Jensen, 125) ou sur papier (Sweeney et Eales, 124).

Ces différentes considérations nous ont amené tout d'abord à étudier par chromatographie avec les 2,4-2,5 et 2,6 lutidines sur papier, sur couche mince ou sur d'autres supports, les points suivants :

- L'amélioration de la séparation des deux taches du double spot des uroporphyrines : influence de la nature de la lutidine, de la teneur en eau, de l'atmosphère d'ammoniaque, du pH et du support;

VII.2 - CHROMATOGRAPHIE AVEC LA LUTIDINE -

VII.2.1 - CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER -

VII.2.1.1 - CONDITIONS OPERATOIRES -

Toutes les chromatographies ont été effectuées dans des conditions opératoires identiques :

- cuves de verre cylindriques de 60 cm de hauteur et de 12 cm de diamètre,
- feuilles de papier Whatman N° 1 de 50 cm x 9 cm,
- quantité de solvant : 250 ml,
- chromatographie ascendante,
- température : $22 \pm 1^\circ \text{C}$,
- temps de saturation : 3 heures,
- temps de migration : 20 heures à l'obscurité (longueur parcourue : environ 30 cm).

VII.2.1.2 - INFLUENCE DE LA NATURE DE LA LUTIDINE SUR LE R_F DES UROPORPHYRINES LIBRES -

La lutidine ou diméthyl pyridine (P.M. 107,15) est un liquide huileux à odeur de pyridine et de menthe.

Les lutidines utilisées sont les produits commerciaux livrés avec les caractéristiques suivantes:

- 2,4 lutidine Merck pour chromatographie,
- 2,4-2,5 lutidine B.D.H. (pourcentage des isomères non indiqué),
- 2,5 lutidine U.C.B. (Belgique) à 96 p 100,
- 2,6 lutidine Schuchardt (Munich) pureté supérieure à 99 p 100,
- autres lutidines : 2,4 lutidine Prolabo
2,6 lutidine Touzard et Matignon.

- SOLVANT DE CHROMATOGRAPHIE -

Les chromatographies ont été effectuées pour chacune de ces lutidines avec le mélange suivant :

lutidine 6 parties
eau distillée 3 parties.

Ce rapport a été défini par le fait que la 2,5 lutidine n'est pas miscible avec une plus grande quantité d'eau à la température du laboratoire.

- RESULTATS -

Pour les différentes lutidines, à l'exception de la 2,5 lutidine, l'uroporphyrine III "FLA." et l'uroporphyrine I "MAT." donnent 2 spots, le plus rapide présentant une faible fluorescence. Ces résultats sont réunis dans le tableau suivant :

Lutidines	Premier spot		Deuxième spot	
	R _F	fluorescence	R _F	fluorescence
2,4 L.Merçk	0,05	+++	0,09	+
2,4-2,5 L.B.D.H.	0,05	+++	0,08	+
2,5 L.U.C.B.	0,01	+++	-	-
2,6 L.Schuchardt	0,03	+++	0,04	-

- CONCLUSION.

1/. Dans tous les cas, l'uroporphyrine I pure donne un spot unique dont le R_F est identique au premier spot des uroporphyrines "FLA." et "MAT.". L'addition à ces uroporphyrines extractives d'uroporphyrine I pure montre que cette dernière migre avec le premier spot des autres porphyrines.

2./ Les constatations suivantes sont faites :

- la 2,5 et la 2,6 lutidines fournissent les R_F les plus faibles,

- en aucun cas ces différentes lutidines conduisent à une répartition quantitativement différente de la fluorescence respective des 2 spots donnés par les uroporphyrines extractives.

VII.2.1.3 - INFLUENCE DE LA TENEUR EN EAU DU SOLVANT SUR LES R_F DES UROPORPHYRINES LIBRES

- SOLVANT DE CHROMATOGRAPHIE.

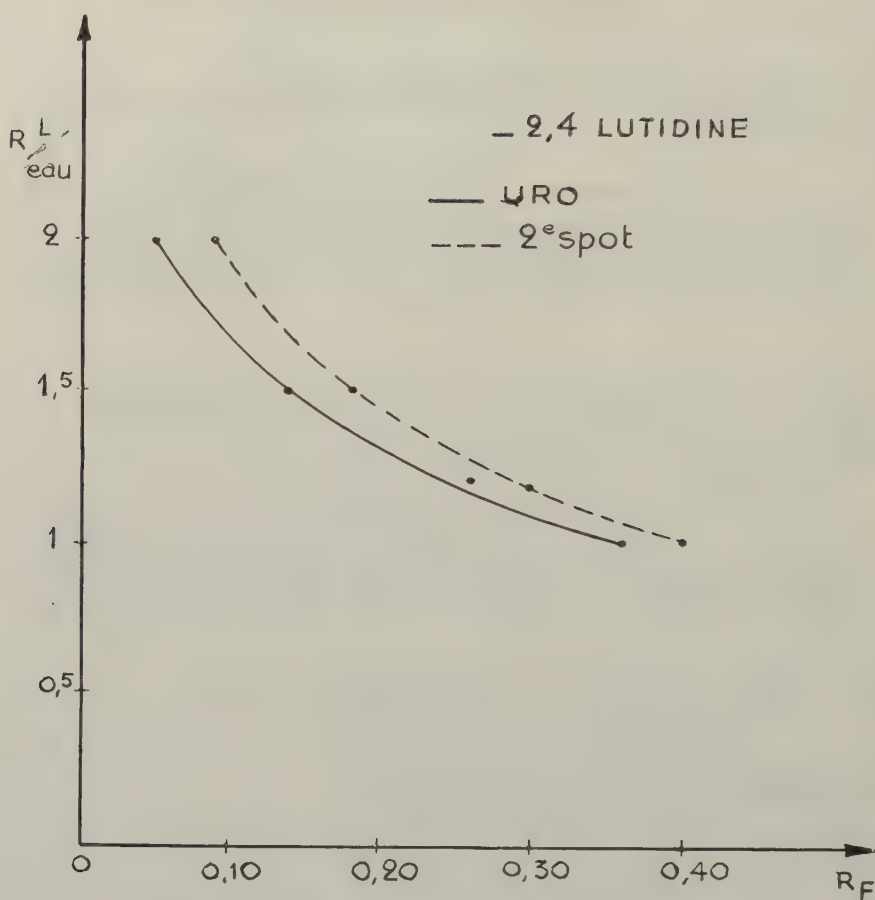
Avec la 2,4 lutidine Merck et la 2,6 lutidine Schuchardt, les plus pures, on prépare les mélanges suivants :

-a/.	Lutidine	6 parties	
	eau distillée	3 parties	rapport = 2
-b/.	Lutidine	6 parties	
	eau distillée	4 parties	rapport = 1,5
-c/.	Lutidine	6 parties	
	eau distillée	5 parties	rapport = 1,2
-d/.	Lutidine	6 parties	
	eau distillée	6 parties	rapport = 1

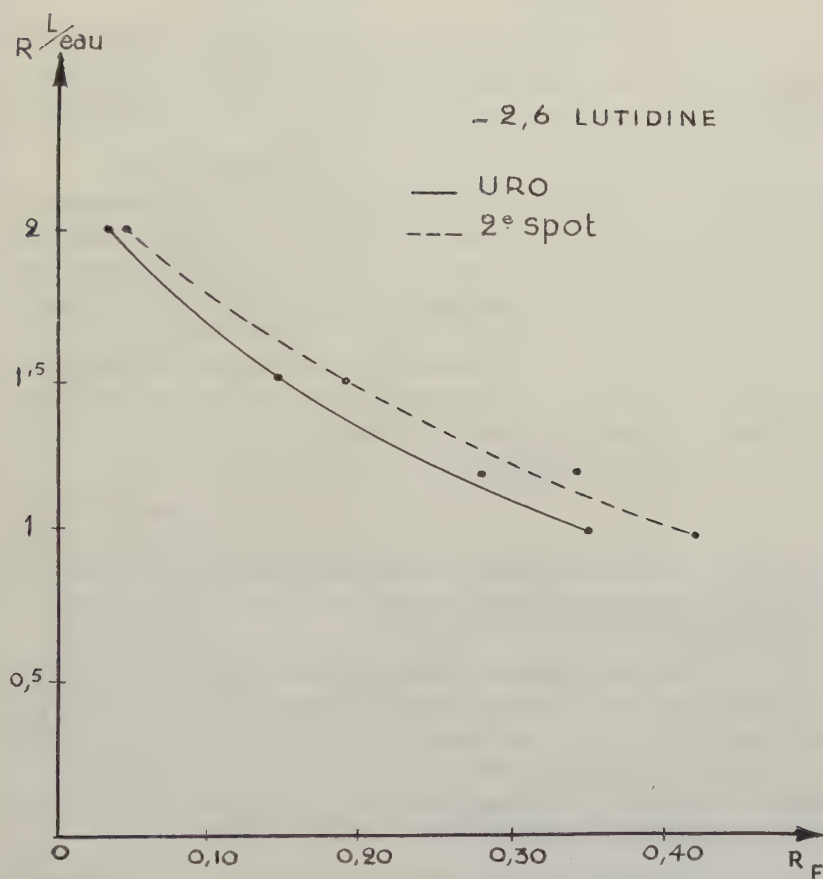
- RESULTATS -

Les chromatographies sont pratiquées dans les mêmes conditions que les essais précédents.

Les résultats sont réunis dans les tableaux suivants (page 116 et 117).



2,4 Lutidine	Premier spot		Deuxième spot	
	R_F	fluorescence	R_F	fluorescence
plus eau 6/3	0,05	+++	0,09	+
- 6/4	0,14	+++	0,18	+
- 6/5	0,26	+++	0,30	+
- 6/6	0,36	+++	0,40	+



2,6 Lutidine	Premier spot		Deuxième spot	
	R_F	fluorescence	R_F	fluorescence
plus eau 6/3	0,03	+++	0,04	+
- 6/4	0,14	+++	0,19	+
- 6/5	0,28	+++	0,34	+
- 6/6	0,35	+++	0,42	+

- CONCLUSION.

1/. Ainsi que l'avaient déjà noté Nicholas et Rimington, la teneur en eau augmente la valeur du R_F de l'uroporphyrine, ce qui est tout à fait en accord avec l'hydrophilie de la molécule.

2/. On ne constate pas de différences quantitatives dans la fluorescence des spots secondaires de "FLA." et "MAT." qui demeure très faible. Les variations de leurs R_F suivent celles du spot principal.

3/. L'influence de la teneur en eau du solvant sur le R_F de l'uroporphyrine libre est représentée dans les deux courbes ci-dessus.

VII.2.1.4 - INFLUENCE DE L'ATMOSPHERE D'AMMONIAQUE SUR LE R_F DES UROPORPHYRINES LIBRES -

L'atmosphère ammoniacale avait été proposée par Nicholas et Rimington (91) et par Ericksen (94) en particulier. Avec un mélange 2,4-2,5 lutidine 6 parties, eau 4 parties; Mac Sweeney, Nicholas et Prunty (104) avaient rapporté une augmentation du R_F des uroporphyrines mais sans en indiquer l'importance.

Ces essais ont été pratiqués dans les mêmes conditions que précédemment avec la 2,6 lutidine en mélanges avec l'eau comme il a été indiqué. L'atmosphère ammoniacale est constituée en introduisant dans la cuve une augette contenant 50 ml d'ammoniaque à 25 p 100(v/v).

- LES RESULTATS sont les suivants :

2,6 Lutidine	Premier spot		Deuxième spot	
	R_F	fluorescence	R_F	fluorescence
plus eau 6/3	0,03	+++	0,04	+
— 6/4	0,14	+++	0,20	+
— 6/5	0,32	+++	0,41	+
— 6/6	0,48	+++	0,52	+

CONCLUSION.

L'atmosphère ammoniacale a pour conséquences :

1/. Une augmentation du R_F de l'uroporphyrine libre apparaissant surtout lorsque le rapport lutidine/eau diminue.

2/. Elle est sans influence sur l'intensité des spots secondaires de "FLA." et "MAT.".

VII.2.1.5 - INFLUENCE DU pH DU SOLVANT SUR LE R_F DES UROPORPHYRINES LIBRES

En faisant varier le pH des solutions de lutidines nous avons voulu vérifier l'influence de l'ionisation du noyau avec apparition des formes dianionique (P^{2-}) et dicationique (PH_2^{2+}) respectivement en milieu alcalin et en milieu acide, sur la séparation des uroporphyrines I et III libres.

- PREPARATION DU SOLVANT DE CHROMATOGRAPHIE.

Nous avons choisi pour ces essais la 2,4 lutidine Merck et la 2,6 lutidine Schuchardt, mélangées avec l'eau dans les proportions 6 parties / 4 parties. Le pH de ces mélanges varie de 10,2 à 10,4.

Pour préparer des solvants ajustés à des pH déterminés, nous avons toujours procédé de la manière suivante : 60 ml de lutidine sont additionnés de 35 ml d'eau distillée, lorsque le mélange est revenu à la température du laboratoire, le pH est ajusté au pH-mètre avec HCl. Le volume est ensuite complété à 100 ml avec de l'eau distillée. Nous avons vérifié que l'ionisation entraînée par cette quantité d'eau ajoutée ne modifie pas le pH final.

- RESULTATS.

La chromatographie ascendante est faite dans les conditions précédemment exposées.

1/. Avec le mélange 2,4 lutidine Merck - eau (6/4) :

pH du solvant	Uro. I pure	Uro. "MAT"	Uro. "VET"	Uro. "FLA"
	R _F fluor.	R _F fluor.	R _F fluor.	R _F fluor.
6,30	1	1	1	1
7,0	0,54 traînée	0,54 traînée	0,54 traînée	0,54 traînée
7,50	0,17	2 spots 0,19 +++ 0,24 +	2 spots 0,19 +++ 0,23 +	2 spots 0,19 +++ 0,24 +
7,80	0,14	2 spots 0,15 +++ 0,23 +	1 spot 0,15 +++	2 spots 0,15 +++ 0,23 +
8,0	0,15	2 spots 0,17 +++ 0,23 +	1 spot 0,15 +++	2 spots 0,17 +++ 0,23 +
8,20	0,14	2 spots 0,14 +++ 0,23 +	1 spot 0,13 +++	2 spots 0,14 +++ 0,23 +
10,30	0,14	2 spots 0,14 +++ 0,18 +	2 spots 0,14 +++ 0,18 +	2 spots 0,14 +++ 0,18 +

2/. Avec le mélange 2,6 lutidine Schuchardt - eau (6/4) :

pH du solvant	Uro.I pure	uro. "MAT"	Uro. "VET"	Uro. "FLA"
	R _F fluor.	R _F fluor.	R _F fluor.	R _F fluor.
7,0	-	2 spots 0,41 +++ 0,51 +	2 spots 0,44 +++ 0,50 +	2 spots 0,41 +++ 0,51 +
7,58	-	2 spots 0,16 +++ 0,24 +	1 spot 0,14 +++	2 spots 0,16 +++ 0,24 +
7,85	-	2 spots 0,16 +++ 0,20 +	1 spot 0,14 +++	2 spots 0,16 +++ 0,20 +
8,0	0,10 +++	2 spots 0,13 +++ 0,19 +	1 spot 0,14 +++	2 spots 0,13 +++ 0,19 +
8,50	0,16 +++	2 spots 0,15 +++ 0,20 +	1 spot 0,11 +++	2 spots 0,15 +++ 0,20 +
9,0	0,09 +++	2 spots 0,09 +++ 0,12 +	1 spot 0,08 +++	2 spots 0,09 +++ 0,12 +
10,4	-	2 spots 0,14 +++ 0,19 +	2 spots 0,14 +++ 0,19 +	2 spots 0,14 +++ 0,19 +

- CONCLUSION.

1/. On note une tendance à l'augmentation du R_F de l'uroporphyrine lorsque le pH se rapproche de la neutralité. Toutes les conditions expérimentales étant identiques, les petites variations rencontrées dans les R_F des différents étalons d'uroporphyrine peuvent être considérées comme non significatives et compatibles avec les variations observées habituellement en chromatographie de partage sur papier pour les mêmes composés.

2/. Pour tous les pH, l'uroporphyrine I pure donne un spot unique alors que les étalons "MAT" et "FLA" produisent 2 taches et que "VET" les présente d'une manière inconstante. Lorsque le spot double existe la fluorescence est très intense pour le plus petit R_F , tandis qu'elle est très faible pour le spot secondaire.

3/. Les spots les plus fluorescents migrent parallèlement à l'étalon d'uroporphyrine I pure. Il s'agit donc bien d'uroporphyrine mais la séparation des isomères I et III n'a pas lieu. En effet, si cette séparation existait les étalons "VET" et "FLA" provenant de porphyrines aiguës (uroporphyrine III prédominante) devraient présenter le maximum de fluorescence pour des R_F différents de l'uroporphyrine I pure et de l'étalon "MAT" de porphyrine cutanée (uroporphyrine I prédominante).

4/. Dans ces conditions le spot secondaire n'est certainement pas une porphyrine octacarboxylique. Si en effet, il s'agissait d'un isomère I ou III d'uroporphyrine, les différents solvants de chromatographie essayés auraient conduit à un moment quelconque à une séparation plus ou moins parfaite se traduisant par l'augmentation de l'intensité de la fluorescence.

VII.2.1.6 - CHROMATOGRAPHIE DESCENDANTE ET CHROMATOGRAPHIE HORIZONTALE -

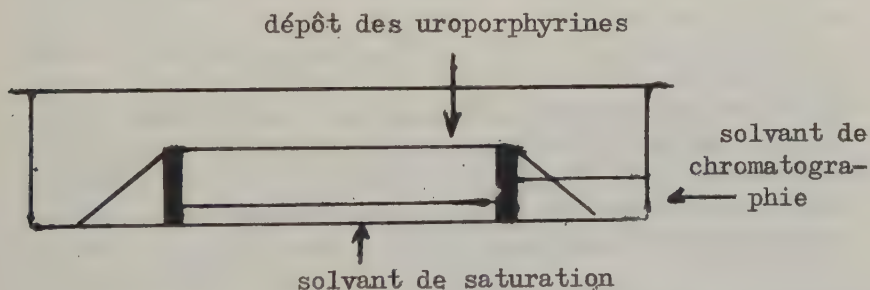
Les chromatographies ont été pratiquées sur papier Whatman N° 1 avec les différentes lutidines en faisant varier d'une part la quantité d'eau, d'autre part le pH, comme dans les essais précédents en chromatographie ascendante.

La chromatographie descendante ne conduit à aucun résultat supplémentaire sinon à un étirement des spots.

La chromatographie horizontale a été utilisée selon 2 procédés :

- chromatographie circulaire : il n'y a pas de séparation des uroporphyrines I et III.

- chromatographie horizontale avec un appareillage du type ci-dessous :



Le solvant est introduit par une ouverture du couvercle après un temps de saturation de 3 heures.

On n'obtient pas non plus de séparation des isomères I et III.

VII.2.1.7 - ESSAIS DE CHROMATOGRAPHIE SUR DIFFERENTS PAPIERS -

Les papiers suivants ont été employés :

- papier Arche 302, lavé, d'épaisseur moyenne,
- papier Schleicher et Schull N° 2043 a : dureté et rapidité moyennes, voisin du papier Whatman N° 1.

Les résultats obtenus sont identiques à ceux donnés par le papier Whatman N° 1.

VII.2.2. - CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE -

A la suite de la séparation des isomères des coproporphyrines sur papier signalée par Ericksen (123) avec la 2,6 lutidine, Jensen (125) a appliqué le principe de la technique à la chromatographie sur couche mince. Il a utilisé comme support du gel de silice G dans la proportion de 30 g pour 60 ml d'eau, étalé sur une épaisseur de 250μ . Le solvant était la 2,6 lutidine mélangée avec l'eau dans la proportion de 20 ml de 2,6 lutidine pour 6 ml d'eau. L'atmosphère était saturée de vapeurs d'ammoniaque. Les coproporphyrines sont déposées en solution ammoniacale (moins de $1\mu\text{g}$). En deux heures, les coproporphyrines I et III sont séparées d'une manière satisfaisante : coproporphyrine I $R_F = 0,19$, coproporphyrine III $R_F = 0,25$.

- ESSAIS PERSONNELS-

Nous avons repris cette technique en essayant de l'appliquer à la séparation des uroporphyrines I et III, libres.

Pour ces essais nous avons utilisé :

- Deux lutidines : 2,4 lutidine Merck
2,6 lutidine Schuchardt,
- Deux types de support : Kieselgel G Merck
Kieselgur G Merck.

De la même manière que pour la chromatographie sur papier, nous avons fait varier :

- la quantité d'eau du solvant,
- le pH du solvant.

Ces solvants étaient préparés dans les conditions précédemment exposées.

Les plaques utilisées sont des plaques de verre de 200 x 200 mm, sur lesquelles le support est réparti sur une épaisseur de 250μ .

La température était de 22-24° C.

- RESULTATS -

Les chromatographies effectuées respectivement avec la 2,4 et la 2,6 lutidine ont donné des résultats équivalents. Il en est de même pour les 2 supports, Kieselgel et Kieselgur. Aussi avons-nous groupé ces résultats.

1/. Influence de la teneur en eau du solvant.

La lutidine est mélangée avec l'eau dans les rapports lutidine-eau de 1,2 - 1,5 - 1,66 - 2,33 - 3,33.

Il n'y a pas de déplacement des différentes uroporphyrines, sinon parfois une traînée légère sans séparation.

2/. Influence de l'atmosphère d'ammoniaque.

Les résultats sont identiques.

3/. Influence du pH du solvant.

Des mélanges lutidine - eau dans les mêmes rapports que précédemment sont ajustés à des pH compris entre 7 et 8,2 séparés par des intervalles de 0,1 unité.

La migration des uroporphyrines augmente lorsque la teneur en eau augmente d'une part, et

lorsque le pH tend vers la neutralité d'autre part. En particulier à pH 7,0 et pour un rapport lutidine/eau de 1,2 les uroporphyrines migrent avec le front du solvant.

En aucun cas, on observe une séparation des isomères.

VII.2.3 - CHROMATOGRAPHIE SUR D'AUTRES

SUPPORTS

Nous avons utilisé pour ces essais des papiers spéciaux récemment réalisés par la firme Kodak. Ils sont constitués par le dépôt d'une couche mince de substance sur un support plastique.

Les papiers à notre disposition, PE 3516 étaient de 2 types :

- K 301 V, sensiblement équivalent à une couche mince de silice, utilisable en chromatographie d'adsorption et de partage.

- K 541 V, couche organique spéciale préparée à partir d'un polyamide sous une forme microprécipitée, utilisable en chromatographie de partage.

Nos essais avec ces nouveaux supports sont identiques à ceux effectués en couche mince selon Stahl.

Ils ne semblent pas fournir de séparation des isomères. Cependant, avant de conclure, d'autres essais devraient être effectués qui n'ont pas été permis en raison de la rareté actuelle de ces supports.

VII.3 - CHROMATOGRAPHIE AVEC D'AUTRES SOLVANTS -

Pour chacun de ces solvants nous donnerons les raisons qui nous ont amenés à les essayer.

VII.3.1 - ACETATE D'ETHYLE -

Waldenström (19) avait proposé l'acétate d'éthyle pour extraire l'uroporphyrine III à pH 3,0-3,5 des urines de porphyries aiguës. Selon cet auteur, l'isomère I n'est pas soluble dans ces conditions. L'étude de solubilité reprise par Dresel, Rimington et Tooth (50) montra que les 2 isomères étaient également solubles dans l'acétate d'éthyle à pH 3,0-3,2. Il semble que cette solubilité n'ait pas été retrouvée par Schwartz et ses collaborateurs (78).

- ESSAIS PERSONNELS -

C'est en raison de cette imprécision que nous avons essayé les solvants suivants :

a/. Acétate d'éthyle saturé d'eau et additionné de 5 p 100 (v/v) d'acide acétique.

b/. Acétate d'éthyle saturé de tampon acide-acétate de pH 3,2.

c/. Acétate d'éthyle saturé de tampon acide acétique-acétate comme b/ mais amené à pH 3,1 avec HCl.

d/. Mélange :	acétate d'éthyle	20 ml
	2,4 lutidine	60 ml
	eau distillée	20 ml

Les chromatographies étaient ascendantes sur papier Whatman N° 1.

- RESULTATS -

Avec ces 4 solvants nous n'avons pas constaté de migration des spots des uroporphyrines libres étalons ($R_F = 0$).

VII.3.2 - CYCLOHEXANONE -

Le rendement à l'extraction des uroporphyrines I et III par la cyclohexanone a été étudié par Dresel, Rimington et Tooth (50). Les résultats satisfaisants de ces auteurs ont été mis en doute par Schwartz et ses collaborateurs (78).

- ESSAIS PERSONNELS -

Nous avons pratiqué des chromatographies sur papier Whatman N° 1 avec les solvants :

a/. Cyclohexanone 15 ml
acétate d'éthyle 140 ml

b/. Cyclohexanone saturée de tampon acide acétique-acétate de pH 3,0.

- RESULTATS -

- Le solvant a/ ne donne pas de migration des uroporphyrines libres : $R_F = 0$.

- le solvant b/ donne une traînée entre $R_F = 0$ et $R_F = 0,10$, sans séparation apparente des isomères.

VII.3.3. - ALCOOLS -

Les solubilités des uroporphyrines dans certains alcools ont aussi été discutées, en particulier en ce qui concerne le n-butanol (78). Les alcools ne sont pas de bons solvants des porphyrines libres.

- ESSAIS PERSONNELS -

Deux alcools nous ont servi à la préparation de solvants de chromatographie : le n-butanol et

l'éthanol. Sur les 4 solvants, 2 sont alcalins :

a/. Butanol	90 ml
NaOH 0,1 N	5 ml
Eau	5 ml
b/. Butanol saturé d'eau	
c/. Ethanol à 95°	80 ml
NH ₄ OH à 10 % (v/v)	4 ml
Eau	16 ml
d/. Ethanol à 95°	50 ml
NH ₄ OH à 10 % (v/v)	4 ml
Eau	46 ml

- RESULTATS -

- Les solvants a/, b/ et c/ ne donnent pas de déplacement des uroporphyrines libres : $R_F = 0$.

- Le solvant d/ donne une traînée de $R_F = 0$ à $R_F = 0,50$ sans aucune séparation, produisant évidemment des pertes considérables de porphyrines au cours du transport. Si les uroporphyrines étaient des acides plus forts, il est probable que ce type de système solvant amènerait une séparation des isomères comme il est possible de l'obtenir avec certains acides polycarboxyliques.

VII.3.4 - TAMPON TRIS HYDROXYMETHYL AMINOME-

THANE -

Nous avons surtout utilisé le tampon "Tris" en électrophorèse sur papier. Nous espérons, en chromatographie sur papier, augmenter les possibilités de séparation des uroporphyrines I et III par la présence d'EDTA comme agent de chélation des traces de métaux contenues dans les papiers et les solvants qui pourraient former des chélates avec les porphyrines.

- ESSAIS PERSONNELS -

Trois solvants ont été préparés et contrôlés sur papier Whatman N° 1 :

a/. Tampon "Tris" pour électrophorèse (voir plus loin).

b/. Solution de "Tris" 0,05 M ajustée à pH 6,40 - 7,0 et 7,50.

c/. 2,4 lutidine ou 2,6 lutidine 6 parties
 Solution de "Tris" 0,05 M 4 parties
 Acide chlorhydrique q s p pH : 7,70 - 7,72 - 7,78 - 7,90 et 7,94.

- RESULTATS -

- Les différents solvants a/ et b/ ne donnent pas de migration des uroporphyrines libres.

- Les solvants c/ forment 2 spots avec les 4 uroporphyrines étalons :

1er spot : $R_F = 0,08-0,10-0,13$. Fluorescence : +++

2e spot : $R_F = 0,14-0,18-0,23$. Fluorescence : +

Les résultats ne sont pas supérieurs à ceux obtenus avec le mélange lutidine-eau (6/4) aux mêmes pH. Il n'y a pas de séparation des isomères.

VII.4 - CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIERS ECHANGEURS D'IONS -

La séparation des isomères des uroporphyrines libres n'a pas été abordée à notre connaissance, par chromatographie sur papiers échangeurs d'ions.

VII.4.1 = PAPIERS ECHANGEURS DE CATIONS =

= PAPIERS =

= Whatman P 81. Forme H^+ , groupements acides forts et faibles.

= Schleicher et Schull imprégné de 5 p 100 de Dowex 50.

= SOLVANTS =

= Mélanges : 2,4 lutidine 6 parties
Eau 4 parties

Acide chlorhydrique q s p. pH : 6,50 - 7,0 - 7,50 et 8,0.

= RESULTATS =

pH 6,50 pH 7,0 pH 7,50 pH 8,0

Whatman P 81 R_F	1	0,75	0,60	0,55
Schleicher et Schull Dowex 50 R_F	 longues traînées			

VII.4.2 = PAPIERS ECHANGEURS D'ANIONS =

= PAPIERS =

= Whatman AE 30 (= AE 81), échangeur d'anions faible. Actif à pH inférieurs à 9,0.

= Schleicher et Schull imprégné de 5 p 100 de Dowex 2 x 8.

- SOLVANTS -

Les mêmes que dans les essais précédents.

- RESULTATS -

	pH 6,50	pH 7,0	pH 7,50	pH 8,0
Whatman AE 30 R_F	0	0	0	0
Schleicher et Schull Dowex 2x8 R_F	1	traînée de 0 à 0,30	0	0

Lorsqu'une migration a lieu, on ne constate pas de séparation des uroporphyrines I et III libres.

Il n'y a pas formation de double spot pour les uroporphyrines "MAT", "VET" et "FLA".

VII.5 - ELECTROPHORESE SUR PAPIER -

Nous avons rapporté dans la première partie de ce travail les techniques électrophorétiques proposées par divers auteurs pour la séparation des porphyrines polycarboxyliques.

- ESSAIS PERSONNELS -

Ces essais ont été pratiqués sur appareil Elphor H (tension 120 v.).

TAMPONS

1/. Tampon "Tris-EDTA" préconisé par Biserte et ses collaborateurs pour l'électrophorèse sur papier des protéines sériques (135). Les protéinogrammes révèlent des séparations meilleures et un nombre de fractions supérieur à celui donné par les tampons courants.

Ce tampon n'avait pas été employé jusqu'ici pour l'électrophorèse des porphyrines libres.

Il a la composition suivante :

Tris hydroxyméthyl aminométhane	60,50 g (= 0,05 M)
E D T A	6 g (= 0,021M)
Acide borique	4,60 g (= 0,075M)
Eau distillée q s p	1000 ml

pH = 8,90. Force ionique = 0,08.

2/. Tampon barbital-acétate-HCl :

Barbital sodique	9,81 g
Acétate de sodium	6,48 g
Acide chlorhydrique	0,1 N 60 ml
Eau distillée q s p	1000 ml

pH = 8,60. Force ionique = 0,10.

PAPIERS

Trois papiers ont été essayés :

-- Schleicher et Schull 2043 a Mg I

-- Whatman N° 1

-- Arche 302.

— RESULTATS —

Les uroporphyrines étalons libres étaient déposées sur le papier imprégné du tampon, en solution dans l'ammoniaque 2 N (1 à 5 μ g).

Dans tous les cas on a obtenu un déplacement des uroporphyrines mais sans séparation des isomères et sans apparition du spot secondaire trouvé par chromatographie sur papier pour les uroporphyrines extractives.

- V I I I -

DISCUSSION

- APPLICATION DE LA METHODE DE CORNFORD ET BENSON AUXPRELEVEMENTS BIOLOGIQUES A FAIBLE TENEUR EN UROPORPHY-RINES -

Les essais de séparation des isomères I et III de l'uroporphyrine libre que nous venons d'exposer, se sont révélés négatifs. Les causes résident probablement dans les propriétés physicochimiques du noyau porphyrine de base et le peu de variété des chaînes latérales de l'uroporphyrine.

Nos essais sur des uroporphyrines libres peuvent se justifier par la présence du "second spot d'uroporphyrine" dont la nature exacte a été discutée par différents auteurs. Les variations observées dans le comportement chromatographique de ce spot ont pu faire penser réellement à une uroporphyrine, d'autant plus qu'il peut exister dans certains échantillons d'esters octaméthyliques bien purifiés. C'était le cas des esters que nous avons obtenus à partir d'urines de porphyries. Les techniques analytiques auxquelles nous les avons soumis nous ont montré qu'il ne peut pas s'agir d'un isomère de l'uroporphyrine. Nous pensons avec Lockwood et Davis (102) qu'il s'agit certainement d'un isomère ou d'un groupe d'isomères de porphyrines heptacarboxyliques. Ces auteurs d'une part, Comfort et ses collaborateurs (111) d'autre part, ont en effet montré que cette structure chimique n'est pas en désaccord avec un R_f extrêmement voisin de celui de l'uroporphyrine sur les

chromatogrammes dans la lutidine. On sait maintenant, qu'il n'existe pas de relation linéaire entre le nombre de groupements carboxyliques et le R_F sur de tels chromatogrammes ainsi qu'on l'avait pensé initialement.

Pour cette raison, mais aussi pour des possibilités de présence de porphyrines hexa- ou pentacarboxyliques, le maximum de sécurité est trouvé actuellement dans la séparation des isomères sur les esters méthyliques selon Cornford et Benson.

Dans le cas de prélèvements biologiques peu abondants ou peu riches en porphyrines, l'urine en particulier, c'est-à-dire lorsqu'il n'est pas possible d'obtenir des esters méthyliques cristallisés, nous opérons de la manière suivante :

Après élimination des porphyrines éthéro-solubles, les uroporphyrines sont extraites par la cyclohexanone selon Dresel, Rimington et Tooth (50). La cyclohexanone est évaporée sous vide. L'estérification est pratiquée sur le résidu. Les esters sont purifiés par chromatographie sur alumine et les porphyrines identifiées par chromatographie sur papier dans la lutidine après hydrolyse. Le pourcentage des isomères I et III de l'uroporphyrine est déterminé par la méthode de Cornford et Benson dans les conditions que nous avons indiquées.

CONCLUSIONS

- Dans une première partie sont envisagées les données récentes concernant la chimie, la biosynthèse des porphyrines et la classification des porphyries fondée sur l'aspect biochimique des troubles de leur métabolisme en liaison avec leurs formes cliniques et en opposition avec les porphyrinuries secondaires. Les méthodes générales de recherche, dosages, identification des porphyrines, de leurs précurseurs et de leurs isomères dans les milieux biologiques permettant le diagnostic biochimique d'une porphyrie, sont exposées.

- L'étude qualitative et quantitative des isomères I et III de l'uroporphyrine extraite des milieux biologiques, très importante pour classer une porphyrie, nécessite la mise en oeuvre de techniques particulières et longues, rendues souvent très difficiles par les très faibles quantités de substances de départ.

- Dans une deuxième partie, sont exposées les méthodes permettant d'obtenir des échantillons purs d'esters méthyliques d'uroporphyrines cristallisés à partir d'urines d'une porphyrie cutanée dite de l'adulte et de deux porphyries aiguës intermittentes.

La méthode de Cornford et Benson est adoptée comme référence pour la détermination du pourcentage des isomères I et III de ces uroporphyrines extractives utilisées comme matériel d'expériences.

Nous avons recherché une méthode donnant les mêmes résultats à partir d'uroporphyrines libres en vue de l'appliquer à des extraits biologiques relativement purs obtenus en très petites quantités et de réduire la durée des opérations.

Les essais suivants ont été effectués :

- chromatographie sur papier et sur couche mince avec diverses lutidines (2,4 - 2,5 et 2,6 lutidines) en faisant varier les conditions de teneur en eau, de pH et d'atmosphère ammoniacale.
- chromatographie sur papier avec d'autres solvants : acétate d'éthyle, cyclohexanone, alcools, tampons, etc..
- chromatographie sur d'autres supports analogues aux couches minces.
- chromatographie sur papiers échangeurs de cations et d'anions.
- électrophorèse sur papier en tampons alcalins.

Dans tous les cas, il n'a pas été possible de séparer l'uroporphyrine I et l'uroporphyrine III libres.

Le spot secondaire accompagnant les uroporphyrines sur les chromatogrammes utilisant la lutidine doit être considéré comme une porphyrine heptacarboxylique probable.

- La méthode de Cornford et Benson est seule retenue pour les milieux biologiques, lorsque l'on désire séparer les uroporphyrines I et III à partir de cristaux d'esters octaméthyliques ou d'extraits urinaires obtenus par la cyclohexanone ou l'adsorption sur talc.

Le Président de la Thèse :

Pr. BADINAND

Vu et permis d'imprimer

Lyon, le 9 juin 1965

Vu, le Doyen :

J.F. CIER

Le Recteur, Président du
Conseil de l'Université,

P. LOUIS

B I B L I O G R A P H I E

-
- 1/. - FERRONI E., FICALBI A., PANCONESI E. et SERTOLI A. - *Panminerva Med.* 1962, 4, 376-379.
 - 2/. - PHILLIPS J.N. - *Comprehensive Biochemistry*, 1963, 9, 34-72.
 - 3/. - GRANICK S. et BOROGLAD L. - *J.Biol.Chem.*, 1953, 202, 781.
 - 4/. - RIMINGTON C. - *Biochem.J.*, 1960, 75, 620.
 - 5/. - RIMINGTON C. et SVEINSSON S.L. - *Scand.J.Clin. Lab.Invest.*, 1950, 2, 209.
 - 6/. - WITH J.K. - *Scand.J.Clin.Lab.Invest.*, 1955, 7, 193.
 - 7/. - SHEMIN D. - In *Porphyria Biosynthesis and Metabolism*. Ciba Foundation, Churchill, London, 1955.
 - 8/. - BOGORAD L. - *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 1963, 104, 676-688.
 - 9/. - SCHMID R. - The Porphyrias in the metabolic basis of inherited disease, Stanburry J.B., Mc Graw Hill Edit. New-York, 1960, p. 939-1012.
 - 10/. - BENARD H., GAJDOS A. et GAJDOS-TOROK M. - *Porphyries, Etude clinique et biologique*. 1 vol. 195 pp. Baillière Edit. Paris 1958.
 - 11/. - Proceedings of the International Conference on the Porphyrias, Capetown, 18-24 Sept. 1963. - *S.A.J. Lab.Clin.Med.*, 1963, 9, N° 4.
 - 12/. - RIMINGTON C. et MILES P.A. - *Biochem.J.*, 1951, 50, 202.
 - 13/. - ALDRICH R.A., HAWKINSON V., GRINSTEIN M. et WATSON C.J. - *Blood*, 1951, 6, 685.
 - 14/. - OTTOLENGHI-LODOGLIANI F. et SERCHI G. - *Giorn. Ital.Derm.e Sifil.*, 1951, 92, 1 et 92, 77.

- 15/. - MAGNUS I.A., JANETT A., PRANKERD J.A.J. et RIMINGTON C. - Lancet, 1961, 2, 448-451.
- 16/. - REDEKER A.G., BRONOW R.S. et STERLING R.E. - S.A.J. Lab.Clin.Med., 1963, 9, 235-238.
- 17/. - SWEENEY G.D., DOWDLE E.B., SAUNDERS S.J. et EALES L. - S.A.J. Lab.Clin.Med., 1963, 9, 247-249
- 18/. - GAJDOS A., GAJDOS-TOROK M., MANTZ I.M. et SCHIRARDIN H. - Presse Med. 1965, 73, 119-122.
- 19/. - WALDENSTROM J. - Acta Med.Scand., 1937, Suppl. 82.
- 20/. - GAJDOS A. et GAJDOS-TOROK M. - Symposium on the normal and pathological metabolism of porphyrins, Turin. Panminerva Med., 1962, p. 32.
- 21/. - BARIETY M. et Coll. - Presse Med., 1960, 68, 825-826.
- 22/. - WALDENSTROM J., FINK H. et HOERBURGER W. - Hoppe Seyler Z., 1935, 233, 1.
- 23/. - MERTENS E. - Hoppe Seyler Z., 1936, 248, 1 et 1937, 250, 57.
- 24/. - GRINSTEIN M., SCHWARTZ S. et WATSON C.J. - J. Biol.Chem., 1945, 157, 323.
- 25/. - WATSON C.J., SCHWARTZ S. et HAWKINSON V. - J.biol.Chem., 1945, 157, 345.
- 26/. - RIMINGTON C. - Arch.Biol.Med., 1953, 29, B. 74-75.
- 27/. - RICHARDS F.F. et SCOTT J.J. - Maladies du métabolisme des porphyrines. 2e Congrès Intern. de Biologie, Saclay, Sept.1960, 87-103.
- 28/. - LUDWIG G.D. et GOLDBERG M. - Ann.N.Y.Acad.Sci. 1963, 104, 710-734.
- 29/. - HELLMAN E.S., TSCHUDI D.P., ROBBINS J. et RALL J.E. - J.Clin.Endocrinol.Metab., 1963, 23, 1185-1191.
- 30/. - WENDER M. - Acta Med.Polona, 1963, 4, 411-415. In Chem.Abst., 60, 13706/d.

- 31/. - RIMINGTON C. - Ann.N.Y.Acad.Sci., 1963, 104, 666-675.
- 32/. - DEAN G. - Brit.Med.J., 1953, 2, 1291.
- 33/. - DEAN G. et BARNES H.D. - Brit.Med.J., 1955, 2, 89 et S.A.Med.J., 1959, 33, 274.
- 34/. - HOLTI G., RIMINGTON C., TATE B.C. et THOMAS C. Quart.J.Med., 1958, 27, 1.
- 35/. - BOLGERT M., CANIVET J. et LE SOURD M. - Semaine Hep., Paris, 1953, N° 32, 1587-1607.
- 36/. - MALLEIN R. - Bull.Soc.Chim.Biol., 1955, 37, 731-734
- 37/. - MALLEIN R., THIVOLET J. et BOUCHERAT M. - Bull. Trav.Soc.Pharm. Lyon. 1964, 8, 158-163.
- 38/. - EALES L. - S.A.J.Lab.Clin.Med., 1963, 9, 151-162.
- 39/. - SCHMID R. - Les maladies du métabolisme des porphyrines. 2e Congrès Intern.de Biologie, Saclay. Sept. 1960, p.33-44.
- 40/. - HEAGER-ARONSEN B. - Scand.J.Clin.Lab.Invest., 1960, vol. 12, Suppl.47.
- 41/. - RIMINGTON C. - Proc.Roy.Soc.Med., 1939, 32, 351.
- 42/. - FISCHER H. - In Abderhalden Handbuch der Bioch., Arbeits Methoden, Abt.I, Teil 11, S 169, Lief 211 et Abt.IV, Teil 5, I, S 536.
- 43/. - TROPP C. et PENEW L. - II.Mitt.Dtsch.Arch.Klin. Med., 1937, 180, 411.
- 44/. - WILLSTATER R. et STOLL A. - Untersuchungen über Chlorophyll, Berlin 1913.
- 45/. - SCHUMM C. - Spectrochemische Analyse Naturlich organischer Farbstoffe. Iena. Gustav Fischer, 1937.
- 46/. - HARLAY J. et MALANGEAU P. - J.Pharm.Chimie, 1939, 29, 105.
- 47/. - DOBRINER K. et RHOADS C.P. - New England J.Med., 1938, 219, 1027.
- 48/. - SCHWARTZ S., ZIEVE L. et WATSON C.J. - J.Lab. Clin. Med., 1951, 37, 843.

- 49/. - ASKELVOD R. - Scand.J.Clin.Lab.Invest., 1951, 3, 318.
- 50/. - DRESEL E.I.B., RIMINGTON C. et TOOTH B.E. - Scand.J.Clin.Lab.Invest., 1956, 8, 73-78.
- 51/. - WALDENSTROM J. - Dtsch.Arch.Klin.Med., 1935, 178, 38.
- 52/. - DOBRINER K. - J.Biol.Chem., 1936, 113, 1.
- 53/. - SCHLENKER F.S., DAVIS C.L. et KITCHELL C.L. - Tech.Bull., Registry Med. Technologists, 1963, 33, 57-66.
- 54/. - DAVIS C.L. - Am.J.Clin.Pathol., 1963, 39, 535.
- 55/. - RIMINGTON C. - Biochem.J., 1943, 37, 443.
- 56/. - GOODMAN R.S. et LYON L.J. - J.Am.Med.Assoc., 1962, 182, 1087-1090.
- 57/. - SVEINSSON S.L., RIMINGTON C. et BARNES H.D. - Scand.J.Clin.Lab.Invest., 1949, 1, 2.
- 58/. - ERICKSEN L. - Scand.J.Clin.Lab.Invest., 1951, 3, 121-139.
- 59/. - REINKNIGH W.A. et van KAMPEN E.J. - Clin.Chim. Acta, 1964, 9, 592-594.
- 60/. - HOFFMANN H. - Klin.Wochschr., 1963, 41, 668-669.
- 61/. - TALMAN E.L. - Standard Method of Clin.Chem., 1958, Vol.2, 137.
- 62/. - WATSON C.J. et SCHWARTZ S. - Proc.Soc.Exptl.Biol. Med., 1941, 47, 393.
- 63/. - PRUNTY F.T.G. - Biochem J., 1945, 39, 446.
- 64/. - FORMINJE P. et POULIE N.J. - Pro.Kronnik. Nederl.Weetensch., 1954, 57, 438.
- 65/. - TADEMI L., KAY I.T. et WATSON C.J. - Clin.Chim. Acta., 1962, 7, 890-891.
- 66/. - RIMINGTON C., KROL S. et TOOTH B. - Scand.J.Clin. Lab.Invest., 1956, 8, 251-252.
- 67/. - WALQUIST B. - Physiol.Chem., 1939, 259, 213.
- 68/. - MAUZERALL D. et GRANICK S. - J.Biol.Chem., 1956, 219, 435.

- 69/. - MOORE D.J. et LABBE R.F. - Clin.Chem., 1964, 10, 1105-1111.
- 70/. - SCHUSTER L. - Biochem.J., 1956, 64, 101.
- 71/. - ELLIOTT W.H. - Biochem.J., 1960, 74, 90.
- 72/. - GRANICK S. et van den SCHRIECK M.G. - Proc. Soc.Exptl.Biol.Med., 1955, 88, 270.
- 73/. - SHAWKIA MEHANI - Brit.J.Int.Med., 1964, 21, 78-80. in Chem.Abst., 60, 13558/1.
- 74/. - BERLIN N.I., NEUBERGER A. et SCOTT J.J. - Biochem.J., 1956, 64, 80.
- 75/. - GIBSON K.D., LAVER W.G. et NEUBERGER A. - Biochem.J., 1958, 70, 71.
- 76/. - URATA G. et GRANICK S. - J.Biol.Chem., 1963, 238, 811.
- 77/. - SCHLENKER F.S., TAYLOR N.A. et KIEHN B.P. - Am.J.Clin.Pathol., 1964, 42, 349-354.
- 78/. - SCHWARTZ S., BERG M.H., BOSENMAIER I. et DINSMORE H. - in Glick D., Methods of Biochemical Analysis, 1960, vol. 8, 221-293.
- 79/. - BARNES H.D. - S.A.J.Lab.Clin.Med., 1963, 9, 177-182.
- 80/. - FRENCH J.M., ENGLAND M.T., LINES J. et THONGER E. - Arch.Biochem.Biophys. 1964, 107, 404-408.
- 81/. - EALES L. et SAUNDERS S.J. - S.A.J.Lab.Clin. Med., 1962, 8, 127-138.
- 82/. - H.van den BERG A.A. et GROTEPASS W. - Klin. Woch., 1933, 12, 586.
- 83/. - GRINSTEIN M. et WATSON C.J. - J.Biol.Chem., 1943, 147, 675.
- 84/. - GRINSTEIN M. et WINTROBE M.M. - J.Biol.Chem., 1948, 172, 459.
- 85/. - SCHWARTZ S. et WIKOFF H.M. - J.Biol. Chem., 1952, 194, 563.
- 86/. - WRANNE L. - Acta Paediatrica, Stockholm, 1960, Suppl.124.

- 86 bis - DRESEL E.I.B. et FALK J.E. - Biochem., J. 1956, 63, 388.
- 87/. - NICHOLAS R.E.H. et COMFORT A. - Biochem.J., 1949, 45, 208.
- 88/. - ERICKSEN L. - Scand.J.Clin.Lab.Invest., 1957, 9, 97.
- 89/. - SCHLENKER F.S., DAVIS C.L. et KITCHELL C.L. - Am.J.Clin.Pathol., 1963, 39, 531-540.
- 90/. - PANCONESI E. et SERTOLI A. - Panminerva Med., 1962, 4, 396-397.
- 91/. - NICHOLAS R.E.H. et RIMINGTON C. - Scand.J. Clin.Lab.Invest., 1949, 1, 12.
- 92/. - NICHOLAS R.E.H. et RIMINGTON C. - Biochem.J., 1951, 48, 306.
- 93/. - KEHL R. et STICH W. - Z.Physiol.Chem., 1951, 289, 6.
- 94/. - ERICKSEN L. - Scand.J.Clin.Lab.Invest., 1953, 5, 155.
- 95/. - CORWIN L.M. et ORTEN J.M. - Anal.Chem., 1954, 26, 608.
- 96/. - WITH T.K. - Scand.J.Clin.Lab.Invest., 1957, 9, 395.
- 97/. - PAPASTAMATIS S.C. et KENCH J.R. - Nature, 1952, 170, 33.
- 98/. - ERICKSEN L. - Scand.J.Clin.Lab.Invest., 1958, 10, 39.
- 99/. - WITH T.K. - Scand.J.Clin.Lab.Invest., 1956, 8, 113.
- 100/. - STERLING R.E. et REDEKER A.G. - Scand.J.Clin. Invest., 1957, 9, 407.
- 101/. - VERGHESE N. - J.Clin.Pathol., 1958, 11, 191-192. et Current Med.Pract., 1961, 5, 1-5
- 102/. - LOCKWOOD W.H. et DAVIES J.L. - Clin.Chim.Acta, 1962, 7, 301-308.
- 103/. - IPPEN H. - Klin.Wochschr., 1962 40, 745-748.

- 104/. - Mac SWINEY R.R., NICHOLAS R.E.H. et PRUNTY F. T.G. - Biochem.J., 1950, 46, 147.
- 105/. - SCHWARTZ S., HAWKINSON V., COHEN J. et WATSON C.J. - J.Biol.Chem., 1947, 168, 133.
- 106/. - LEMBERG R. - In FALK J.E., Porphyrins and Metalloporphyrins, 1 vol. 266 pp. Elsevier Publ. Edit., 1964.
- 107/. - NICHOLAS R.E.H. - Biochem.J., 1951, 48, 309.
- 108/. - BISERTE G. - In LERERER E., Chromatohtaphie en chimie organique et biologique, 1960, III, vol. II, p. 588-641. Masson Edit.Paris.
- 109/. - FALK J.E. - Porphyrins and Metalloporphyrins, 1 vol. 266 pp, Elsevier Publ.Edit., 1964.
- 110/. - WEATHERALL M. - Biochem.J., 1952, 52, 683.
- 111/. - COMFORT A., MOORE W. et WEATHERALL M. - Biochem. J., 1954, 58, 177.
- 112/. - LEDERER E. et TIXIER R. - C.R.Ac.Sc., 1947, 225, 531.
- 113/. - JOPE E.M. et O'BRIEN J.R.P. - Biochem.J., 1945, 39, 239-244.
- 114/. - NICHOLAS R.E.H. et RIMINGTON C. - Biochem.J., 1953, 55, 109.
- 115/. - EDMONDSON P.R. et SCHWARTZ S. - J.Biol.Chem., 1953, 205, 605-609.
- 116/. - DOBRINER K. - J.Biol.Chem., 1937, 120, 115.
- 117/. - RIMINGTON C. - Proc.Roy.Soc., London, 1939, 127, 106.
- 118/. - FINCK H. et HOERBURGER W. - Hoppe Seyler Z., 1933, 218, 181. et 1934, 225, 49.
- 119/. - RIMINGTON C. - Biochem.J., 1943, 37, 137.
- 120/. - WATSON C.J. et SCHWARTZ S. - Proc.Soc.Exptl.Brit. Med., 1940, 44, 7.
- 121/. - FALK J.E. - Biochem.Soc.Symp. (Cambridge, England) 1954, 12, 17.
- 122/. - FALK J.E. - Brit.Med.Bull., 1954, 10, 211.

- 123/. - ERICKSEN L. - Scand.J.Clin.Lab.Invest., 1958, 10, 319.
 - 124/. - SWEENEY C.D. et EALES L. - Scand.J.Clin.Lab. Invest., 1964, 16, 250-251.
 - 125/. - JENSEN J. - J.Chromatog., 1963, 10, 236.
 - 126/. - CHU T.C., GREEN A.A. et CHU E.J. - J.Biol. Chem., 1951, 190, 643.
 - 127/. - CHU T.C. et CHU E.J. - J.Biol.Chem., 1957, 227, 505.
 - 128/. - FALK J.E. et BENSON A. - Biochem.J., 1953, 55, 101.
 - 129/. - BOGORAD L. et GRANICK S. - J.Biol.Chem., 1953, 202, 793.
 - 130/. - MICHAELLE C. et KOMARKOVA A. - Naturwissenschaft 1956, 43, 19.
 - 131/. - CORNFORD P.A.D. et BENSON A. - J.Chromatog., 1960, 10, 141-157.
 - 132/. - CHU T.C. et CHU E.J. - J.Biol.Chem., 1954, 208, 537.
 - 133/. - EIGENBERGER E. - J.Prakt.Chem., 1931, 130, 75.
 - 134/. - BOGORAD L. et MARKS G.S. - Biochem.Biophys.Acta 1960, 41, 356.
 - 135/. - BISERTE G., PAYSANT P., HAVEZ R. et RACADOT A. - Ann.Biol.Clin., 1960, N° 10-12, 603.
-

TABLE DES MATIERES

p.

PREMIERE PARTIE : GENERALITES

I - Chimie des porphyrines	3
II - Propriétés physicochimiques des porphyrines	6
III - Coproporphyrines	14
IV - Uroporphyrines	16
V - Protoporphyrines	18
VI - Biosynthèse des porphyrines	20
VII - Les porphyries	27
VIII - Les porphyrinuries secondaires	41
IX - Recherche, dosage, séparation et identification des porphyrines et de leurs précurseurs dans les milieux biologiques	45
X - Taux normaux des porphyrines dans les milieux biologiques	64
XI - Examens de laboratoire à pratiquer dans le diagnostic biochimique d'une porphyrie	67

DEUXIEME PARTIE : TRAVAUX PERSONNELS

I - Introduction	71
II - Techniques utilisées	73
III - Préparation d'esters octaméthyliques du d'uroporphyrines à partir des urines	88
IV - Applications à des urines de porphyries : préparation d'étalons d'esters octaméthyliques d'uroporphyrines	95

V - Méthodes de détermination quantitative des isomères I et III de l'uroporphyrine estérifiée	98
VI - Choix d'une méthode de référence pour la détermination des isomères I et III de l'uroporphyrine estérifiée	107
VII - Essais de séparation des isomères I et III de l'uroporphyrine libre par d'autres méthodes	110
VIII - Discussion. Application de la méthode de Cornford et Benson aux prélèvements biologiques à faible teneur en uroporphyrines	135
CONCLUSIONS	137
Bibliographie	139
